

---

# Sehnen- und Ligamentbildung durch mesenchymale Stammzellen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sandra Shahab-Osterloh  
aus Braunschweig

---

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Privatdozent Dr. Gerhard Gross

Professor Dr. Jürgen Wehland

18.02.2008

25.04.2008

Druckjahr 2008

---

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Hoffmann A, Pelled G, Turgeman G, Eberle P, Zilberman Y, Shinar H, Keinan-Adamsky K, Winkel A, **Shahab S**, Navon G, Gross G, Gazit D.

Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. Journal of Clinical Investigation. 2006 Apr;116 (4) 940-52

### **Tagungsbeiträge**

**Shahab S.**, Gerhard G., Hoffmann A., Seiffart V. (2007) Potential Factors in MSC-dependent Tendon/Ligament Formation. EU-Framework 6 Genostem, Barcelona

**Shahab S.**, Hoffmann A., Seiffart V., Winkel A., Hertwig, F., Colecchia, F., Nuber, U.A., Gross, G. (2007) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Potential Factors Involved in Tendon/Ligament Formation. EU-Framework 6, Genostem, Barcelona

Hoffmann A., **Shahab S.**, Seiffart V., Winkel A., Ringe J., Häupl T., Gross G. (2007) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cells Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation. EU-Framwork 6, Genostem, Barcelona

Gross, G., Hoffmann, A., Seiffart, V., **Shahab, S.** (2007) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation. EU-Framework 6 Genostem, Barcelona

Hoffmann A., Witte F., **Shahab S.**, Winkel A., Pelled, G., Chernajovsky, Y., Häupl, T., Gross, G. (2007) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation – Targeting of MSCs to Cartilage Tissue. 2. Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung, Würzburg

Hoffmann A., Witte F., **Shahab S**, Winkel A., Pelled, G., Chernajovsky, Y., Häupl, T., Gross, G. (2007) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation – Targeting of MSCs to Cartilage Tissue. 4<sup>th</sup> International Stem Cell Meeting, Düsseldorf

Hoffmann A., Witte F., **Shahab S**, Winkel A., Pelled, G., Chernajovsky, Y., Moll, G., Häupl, T., Gross, G. (2006) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation – Targeting of MSCs to Cartilage Tissue. 3. Internationales Meeting des Kompetenznetzwerks Stammzellforschung NRW, Münster, Posterpreis

Hoffmann, A., Hertwig, F., **Shahab S.**, Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Winkel, A., Witte, F., Gross, G., Nuber, U.A. (2006) Gene Expression Analysis of a Stable Mesenchymal Progenitor Line (C3H10T1/2-BMP2/Smad8ca) Differentiating into Tendon-forming Cells. EU-Framework 6 Genostem, Porto

Hoffmann, A., Witte, F., **Shahab, S.**, Winkel, A., Pelled, G., Gazit, G., Chernajovsky, Y., Moll, Ringe, J., G., Häupl, T., Gross, G. (2006) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation – Targeting of MSCs to Cartilage Tissue. 6<sup>th</sup> International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Dubrovnik

Hoffmann, A., Witte, F., **Shahab, S.**, Winkel, A., Pelled, G., Gazit, G., Chernajovsky, Y., Moll, G., Häupl, T., Gross, G. (2006) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders. 2<sup>nd</sup> International Congress on Regenerative Biology, Stuttgart

Hoffmann, A., Witte, F., **Shahab, S.**, Winkel, A., Pelled, G., Gazit, G., Chernajovsky, Y., Moll, G., Häupl, T., Gross, G. (2006) Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation. EU-Framework 6 Genostem, Heraklion

Hoffmann, A., Witte, F., **Shahab, S.**, Winkel, A., Seiffart, V., Peter, S., Gross, G. (2005) Pathways to tendon formation and chimeric BMP-receptors to target MSCs to chondral tissues. ESGT, Prag

Hertwig, F., Hoffmann A., **Shahab, S.**, Lipkowitz, B., Winkel, A., Witte, F., Seiffart, V., Gross, G., Nuber, U.A. (2005) Gene Expression Analysis of aStable Mesenchymal Progenitor Line (C3H10T1/2-BMP2/Smad8ca) Differentiating into Tendon-Forming Cells. 3<sup>rd</sup> Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, San Francisco

Hoffmann, A., **Shahab, S.**, Winkel, A., Seiffart, V., Pelled, G., Gazit, D., Snedeker, J., Müller, R., Gross, G. (2005) The Use of Mesenchymal Stem Cells for Tendon Repair. Executive Committee Meeting, EU-Framework 6 Genostem, Paris

Hoffmann A., **Shahab, S.**, Winkel, A., Seiffart, V., Gross, G. (2005) Inflammatory signalling and its cross-talk during tissue development and regeneration. British Society of Rheumatology Annual Meeting “Regenerative Medicine and Gene Therapy”, Birmingham

Hoffmann, A., **Shahab S.**, Winkel, A., Gross, G. (2005) The Use of MSCs for tendon repair. EU-Framework 6 Genostem, Rom

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	VIII
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Sehnen.....	1
1.1.1 Makroskopischer Aufbau von Sehnen.....	1
1.1.2 Mikroskopischer Aufbau von Sehnen.....	3
1.1.3 Extrazelluläre Sehnenmatrix.....	6
1.1.4 Sehnenzellen (Tenoblasten und Tenozyten).....	7
1.2 Embryonale Entwicklung und Differenzierung von Sehnen.....	8
1.2.1 Molekulare Marker während der Differenzierung von Sehnen.....	11
1.2.1.1 Extrazelluläre Matrixmoleküle.....	11
1.2.1.2 Wachstumsfaktoren und Antagonisten.....	12
1.2.1.3 Transmembranproteine.....	12
1.2.1.4 Transkriptionsfaktoren.....	12
1.3 Heilungsprozess von gerissenen Sehnen.....	13
1.4 Stammzellen.....	15
1.5 BMP2-exprimierende mesenchymale Stammzellen bilden nach ihrer Implantation in vivo durch zwei Mechanismen Knochen: autokrin und parakrin.....	16
1.6 Die TGF- $\beta$ Superfamilie.....	17
1.6.1 BMP (Bone Morphogenetic Protein = Knochenmorphogeneseprotein).....	18
1.6.2 Die BMP-Rezeptoren.....	18
1.6.3 Die Smad-Proteine und ihre Funktionen.....	19
1.7 Auswirkungen von Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung von C3H10T1/2BMP2-Zellen.....	20
1.8 Einsatz von viralen Vektoren in der Gentherapie – Adenoviren versus Lentiviren.....	21
<b>2 Ziele der Doktorarbeit</b> .....	23
<b>3 Material und Methoden</b> .....	24
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR – Polymerase Chain Reaction).....	24
3.1.1.1 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR).....	24
3.1.2 Real Time PCR.....	24
3.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung von DNA.....	26
3.1.4 Agarose- /LMP-Gelelektrophorese.....	26
3.1.5 Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose.....	27
3.1.5.1 High Pure PCR-Product Purification Kit (Roche).....	27
3.1.6 Restriktion von DNA.....	27
3.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	28
3.1.8 Ligation von DNA.....	28
3.1.9 Sequenzierung von DNA.....	28
3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
3.1.11 Isolierung von RNA.....	29
3.1.12 cDNA-Synthese.....	30
3.1.13 Klonierung von PCR-Produkten.....	30
3.1.13.1 Klonierungs-PCR.....	31
3.1.13.2 PCR-Screen.....	31
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	32
3.2.1 Lösungen und Medien.....	32
3.2.2 Bakterienstämme.....	32

3.2.3	Herstellung elektrokompeter Zellen .....	32
3.2.4	Transformation von kompetenten Zellen mittels Elektroporation .....	33
3.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli mit dem JETSTAR-System® .....	33
3.3	Proteinchemische Methoden .....	34
3.3.1	Isolierung von Proteinen .....	34
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.3.3	Western Blot.....	35
3.3.3.1	<i>Immunmarkierung und Entwicklung</i> .....	35
3.3.4	RNA-Gelelektrophorese und Northern Blot .....	36
3.3.4.1	<i>Lösungen und Puffer</i> .....	36
3.3.4.2	<i>RNA-Probenvorbereitung</i> .....	37
3.3.4.3	<i>RNA-Gelelektrophorese</i> .....	37
3.3.4.4	<i>Transfer</i> .....	37
3.3.4.5	<i>DNA-Sondenherstellung</i> .....	38
3.3.4.6	<i>Hybridisierung</i> .....	39
3.3.4.7	<i>Waschen, Blockierung und Entwicklung</i> .....	39
3.3.5	Bradford-Test .....	39
3.4	Tierische Zellkultur .....	39
3.4.1	Lösungen und Medien .....	39
3.4.2	Zelllinien .....	41
3.4.3	Kulturbedingungen.....	41
3.4.4	Beschichtung mit Poly-D-Lysin (PDL).....	41
3.4.5	Auftauen von Zellen.....	42
3.4.6	Einfrieren von Zellen .....	42
3.4.7	Passagieren von Zellen.....	42
3.4.8	Fixieren von Zellen mit Paraformaldehyd .....	42
3.4.9	Stabile Transfektion von DNA.....	42
3.4.10	Kinetik der Zelldifferenzierung.....	42
3.4.11	Dokumentation der Morphologie .....	43
3.4.12	Histologische Färbungen.....	43
3.4.12.1	<i>Alkalische Phosphatase Färbung</i> .....	43
3.4.12.2	<i>Eindeckeln der gefärbten Zellen</i> .....	43
3.4.12.3	<i>Dokumentation der gefärbten Zellen</i> .....	43
3.5	Adenoviren.....	44
3.5.1	Übersicht über die Herstellung von Adenovirus mit dem Adeno-X™ Adenoviral Expression System .....	44
3.5.1.1	<i>Klonierung von Zielgenen in pShuttle</i> .....	45
3.5.1.2	<i>Klonierung der Expressionskassette in Adeno-X DNA</i> .....	45
3.5.1.3	<i>Verdau von adenoviraler DNA mit dem Enzym PacI</i> .....	45
3.5.1.4	<i>Transfektion von HEK293LP-Zellen mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung</i> .....	45
3.5.1.5	<i>Ernte von Virusflaschen (FTL)</i> .....	46
3.5.2	Vermehrung und Analyse von Adenoviren.....	46
3.5.2.1	<i>Prä-Infektion 1. Grades</i> .....	46
3.5.2.2	<i>Prä-Infektion 2. Grades</i> .....	47
3.5.2.3	<i>DNA-Isolierung</i> .....	47
3.5.2.4	<i>Protein-Isolierung</i> .....	47
3.5.3	Großproduktion und Aufreinigung von Adenovirus .....	48
3.5.3.1	<i>Infektion von HEK293LP-Zellen mit Adenovirus</i> .....	48
3.5.3.2	<i>Ernte der infizierten HEK293LP-Zellen</i> .....	48
3.5.3.3	<i>CsCl-Gradient und Ultrazentrifugation</i> .....	49
3.5.4	Titration des Virus.....	49

3.5.4.1	Virusvorverdünnung .....	49
3.5.4.2	Titrierung .....	50
3.6	Lentiviren .....	50
3.6.1	Lösungen und Medien .....	50
3.6.2	Produktion von Lentiviren über Calciumphosphat-Transfektion.....	50
3.6.3	Titerbestimmung .....	51
3.6.4	Regulierbare Genexpression: Das Tet-System.....	51
3.6.5	Lentivirus-Infektionen und Kinetik der Zelldifferenzierung.....	53
3.7	Analyse ektopischer Implantationen von Kollagenschwämmen in C3H- Mäuse..	53
3.7.1	Implantation von Kollagenschwämme .....	53
3.7.2	Explantation der implantierten Kollagenschwämme .....	54
3.7.3	Histologische Färbungen .....	54
3.7.3.1	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H & E-Färbung) .....	54
3.7.3.2	Toluidinblau-Färbung .....	55
3.7.3.3	Trichrom-Färbung nach Goldner .....	55
3.7.3.4	Von Kossa-Färbung .....	55
3.7.4	Immunhistochemische Färbungen.....	55
3.7.4.1	$\beta$ 2-Mikroglobulin Färbung .....	55
3.7.4.2	Kollagen Typ III- und GFP-Antikörperfärbung .....	56
3.7.5	Microarray .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	58
4.1	Auswirkungen von Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung von rekombinant exprimierenden C3H10T1/2BMP2-Zellen.....	58
4.1.1	Untersuchung der Genexpression bestimmter Markergene während der Differenzierung .....	58
4.2	Etablierung eines Mausmodells zur Herstellung ektopischer Sehnen .....	61
4.2.1	Modifizierte mesenchymale Vorläuferzellen differenzieren in Knochen-, Knorpel- und Sehnengewebe .....	64
4.3	Adenoviren .....	65
4.3.1	Klonierung der Zielgene in den pShuttle-Vektor .....	66
4.3.2	Entstehung von Plaques .....	67
4.3.3	Aufreinigung aller hergestellten Adenoviren .....	67
4.3.4	Analyse der aufgereinigten Adenoviren Smad8 wt und Smad8 L+MH2 auf Proteinebene .....	67
4.3.5	Bestimmung des Titers der aufgereinigten Adenoviren.....	68
4.3.6	Proteinexpression der aufgereinigten Adenoviren in C3H10T1/2-Zellen .....	69
4.4	Differenzierungsstudie von adenoviral-infizierten C3H10T1/2-Zellen mit Smad8 L+MH2.....	69
4.4.1	Untersuchung der Expression von Markergenen der Bindegewebsentwicklung	70
4.5	Implantation von adenoviral modifizierten murinen mesenchymalen Stammzellen (C3H10T1/2) in C3H/HeN-Mäuse .....	72
4.5.1	Smad8 L+MH2/BMP2-infizierte murine mesenchymale Stammzellen bilden <i>in</i> <i>vivo</i> einen Knochen-Sehnen-Übergang (Enthese).....	74
4.5.2	Smad8 L+MH2 infizierte murine mesenchymale Stammzellen differenzieren in Sehnengewebe .....	76
4.5.3	Smad8 wt- infizierte murine mesenchymale Stammzellen zeigen keine Differenzierung in Sehnengewebe .....	78
4.5.4	Kontrollvirus lacZ hat keinen Einfluss auf die Differenzierung in Sehnengewebe .....	79
4.6	Lentiviren .....	80
4.6.1	Implantation von modifizierten humanen mesenchymalen Stammzellen.....	80

4.6.2	BMP2-infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren in Knochengewebe .....	81
4.6.2.1	<i>Identifizierung der BMP2-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Gewebe mit Hilfe eines human-spezifischen <math>\beta</math>2-Mikroglobulin Antikörpers</i> .....	82
4.6.3	Smad8 L+MH2 und BMP2 infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren in sehnen-ähnliches Gewebe.....	83
4.6.3.1	<i>Identifizierung der Smad8 L+MH2 und BMP2-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Gewebe mit Hilfe eines human-spezifischen <math>\beta</math>2-Mikroglobulin-Antikörpers</i> .....	85
4.7	Screening nach Faktoren, die in der Sehnenbildung eine Rolle spielen könnten ....	86
4.7.1	Analyse des Genexpressionsprofils in C3H10T1/2 <sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> -Zellen .....	86
4.7.1.1	<i>Anordnung der exprimierten Gene in C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen in Gen- Cluster</i> .....	88
4.7.2	Verifizierung der Microarray-Daten .....	90
4.7.2.1	<i>Nachweis von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8L+MH2</sub>-Zellen auf Proteinebene mittels Western Blot</i> .....	90
4.7.2.2	<i>Nachweis von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8L+MH2</sub>-Zellen auf RNA-Ebene mittels Northern Blot</i> .....	90
4.7.2.3	<i>Quantitativer Nachweis von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8L+MH2</sub>-Zellen auf RNA-Ebene mittels Real-Time PCR</i> .....	91
4.8	Klonierung des sekretorischen Faktors Periostin zur Herstellung von Lentiviren... ..	92
4.8.1	Herstellung der Lentiviren .....	93
4.8.2	Bestimmung des Titergehaltes der Lentiviren .....	93
4.9	Differenzierungsstudie mit lentiviral infizierten C3H10T1/2-Zellen .....	93
4.9.1	Untersuchungen der Expression von Markergenen der Bindegewebsentwicklung .....	95
4.10	Implantation von lentiviral-modifizierten murinen Stammzellen in Mäuse: C3H10T1/2-Zellen mit Periostin und Periostin/ caBMPR-IA .....	97
4.10.1	Der Kontrollvirus GFP und der Lentivirus caBMPR-IA üben keinen Einfluss auf die Differenzierung in Sehnengewebe aus .....	99
4.10.2	Periostin und Periostin/caBMPR-IA- infizierte murine mesenchymalen Stammzellendifferenzieren in sehnen-ähnliches Gewebe.....	100
4.11	Implantation von infizierten humanen Stammzellen in Nacktmäuse: huMSCs mit Lentivirus Periostin und Periostin/ caBMPR-IA.....	102
4.11.1	Uninfizierte und GFP-infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren nicht in sehnen-ähnliches Gewebe.....	104
4.11.2	Periostin und caBMP-IA infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren in sehnen-ähnliches Gewebe.....	104
4.11.3	Nachweis der implantierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Sehnengewebe .....	106
4.11.3.1	<i>Die implantierten humanen mesenchymalen Stammzellen befinden sich außerhalb des neu gebildeten Sehnengewebes</i> .....	107
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	110
5.1	Der Einfluss von Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung von rekombinant exprimierende C3H10T1/2 <sub>BMP2</sub> -Zellen .....	110
5.2	C3H10H1/2 <sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> -Zellen differenzieren in Knochen-, Knorpel- und Sehnengewebe .....	111
5.3	Differenzierungsstudie von Ad-Smad8 L+MH2-/Ad-BMP2-, Ad-Smad8 L+MH2- sowie Ad-Smad8-wt infizierten C3H10T1/2-Zellen.....	112



5.4	Implantation von Ad-Smad8 L+MH2-/Ad-BMP2-, Ad-Smad8 L+MH2- sowie Ad-Smad8 wt-infizierten C3H10T1/2-Zellen in C3H/HeN-Mäuse .....	113
5.5	Implantation von LV-Smad8 L+MH2-/LV-BMP2- und LV-BMP2-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen in Nacktmäuse.....	114
5.6	Screening nach Faktoren, die in der Sehnenbildung eine Rolle spielen könnten ..	116
5.7	Differenzierungsstudie von LV-Periostin-/LV-BMP2- und LV-Periostin-infizierten C3H10T1/2-Zellen .....	117
5.8	Implantation von LV-Periostin-/LV-caBMPR-IA- und LV-Periostin-modifizierten murinen Stammzellen in C3H/HeN-Mäuse .....	118
5.9	Implantationen von LV-Periostin- und LV-Periostin/caBMPR-IA-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen in Nacktmäuse.....	120
5.10	Nachweis der implantierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Sehnengewebe .....	120
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	122
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	124
7.1	Geräte .....	124
7.2	Verbrauchsmaterialien .....	124
7.3	Enzyme und Chemikalien .....	125
7.4	Kits .....	125
7.5	Oligonukleotidprimer .....	126
7.6	Molekulargewichtsmarker.....	127
7.7	Verwendete Plasmide .....	127
7.8	Vektorkarten.....	128
7.9	Anordnung der exprimierten Gene in C3H10T1/2 <sub>BMP2</sub> -Zellen in Gen-Cluster (Microarray Analyse) .....	130
7.10	Verwendete Computerprogramme / Internet.....	131
7.11	Abkürzungen .....	131
<b>8</b>	<b>Literatur</b> .....	134
	<b>Danksagungen</b> .....	
	<b>Lebenslauf</b> .....	

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung einer Sehnenverbindung mit einem Muskel und einem Knochen .....	1
<b>Abbildung 2:</b> Übersicht der Verbindung von Sehnen mit Muskeln und Knochen.....	2
<b>Abbildung 3:</b> Typischer Aufbau eines Knochen-Sehnen-Überganges (apophysäre Sehnenansatzzone) mit seinen vier Zonen. ....	2
<b>Abbildung 4:</b> Längs geschnittene Sehne eines Menschen. ....	3
<b>Abbildung 5:</b> Bildung der Kollagenfibrille .....	4
<b>Abbildung 6:</b> Hierarchischer Aufbau der Sehnenstruktur von der Kollagenfibrille bis zur vollständigen Sehne..	5
<b>Abbildung 7:</b> Schematischer Querschnitt durch eine Sehne .....	5
<b>Abbildung 8:</b> Ultrastruktur einer Sehne aus einer Ratte, die quer geschnitten wurde.....	8
<b>Abbildung 9:</b> Überblick über die Bildung und Kompartimentierung eines 3-Tage alten Hühnerembryos.....	9
<b>Abbildung 10:</b> Modell der Bildung des Syndetoms.....	10
<b>Abbildung 11:</b> Regulation des Schicksals von Sehnenzellen.....	13
<b>Abbildung 12:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung des Kollagenfibrillenverlaufs der Extensorsehne .....	15
<b>Abbildung 13:</b> Schematische Darstellung der Differenzierungsrichtungen von mesenchymalen Stammzellen..	15
<b>Abbildung 14:</b> Parakriner und autokriner Mechanismen über die Kontrolle der Knochenregenerierung.....	16
<b>Abbildung 15:</b> Signaltransduktion der TGF $\beta$ Superfamilie .....	17
<b>Abbildung 16:</b> Schematische Darstellung des TGF $\beta$ /Smad Signalweges.....	19
<b>Abbildung 17:</b> Phylogenetischer Stammbaum und schematischer Aufbau der Smad Proteine .....	20
<b>Abbildung 18:</b> Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von ektopisch implantierten mesenchymalen Zellen.....	21
<b>Abbildung 19:</b> Ektopische Implantation von C3H10T1/2 <sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> - Zellen in die Achillessehne einer C3H/HeN Maus.....	21
<b>Abbildung 20:</b> Übersicht über die Herstellung von Adenovirus.....	44
<b>Abbildung 22:</b> Prozess der Microarray-Genexpression .....	56
<b>Abbildung 23:</b> Expression bestimmter Markergene während einer Differenzierungsstudie in den Kontrollzellen C3H10T1/2 und den rekombinanten Zelllinien C3H10T1/2 <sup>BMP2</sup> und C3H10T1/2 <sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> .....	59
<b>Abbildung 24:</b> Implantation von modifizierten mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich auf einer Trägermatrix befinden.....	62
<b>Abbildung 25:</b> Explantation von BMP2/Smad8 L+MH2-modifizierten mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich auf einer Trägermatrix befinden.....	63
<b>Abbildung 26:</b> BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin-Blau) .....	64
<b>Abbildung 27:</b> Smad8 L+MH2/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches Gewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin).....	65
<b>Abbildung 28:</b> Klonierung des Zielgens in pShuttle.....	66
<b>Abbildung 29:</b> Zellmorphologie nach adenoviraler Infektion.....	67
<b>Abbildung 30:</b> Proteinanalyse der adenovirus-abhängigen Synthese von Smad8 wt und Smad8 L+MH2 .....	68
<b>Abbildung 31:</b> Analyse der adenoviralen Synthese von Smad8 wt und Smad8 L+MH2 nach der Virusaufreinigung .....	69
<b>Abbildung 32:</b> Expression bestimmter Markergene während der Differenzierungsstudie mit adenoviral infizierten Zellen .....	71
<b>Abbildung 33:</b> Nachweis der Proteinexpression von Smad8 L+MH2 nach adenoviraler Infektion .....	73
<b>Abbildung 34:</b> Smad8 L+MH2/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches und Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin). ....	74
<b>Abbildung 35:</b> Smad8 L+MH2/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches- und Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin-Blau). ....	75
<b>Abbildung 36:</b> Smad8 L+MH2/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Von Kossa). ....	76
<b>Abbildung 37:</b> Nachweis der Proteinexpression von Smad8 L+MH2 in den zu implantierenden Zellen mit Hilfe eines Flag-Antikörpers in einem Western Blot .....	77
<b>Abbildung 38:</b> Smad8 L+MH2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches Gewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin-Blau) .....	77
<b>Abbildung 39:</b> Smad8 L+MH2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches Gewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin-Blau) .....	78
<b>Abbildung 40:</b> Smad8 wt- abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin) .....	79

<b>Abbildung 41:</b> LacZ-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin). Keine Differenzierung der implantierten lacZ-Zellen in Sehngewebe. Der Schwamm lag subkutan vor. KS = Kollagenschwamm, Z = Zellen .....	79
<b>Abbildung 42:</b> HuMSC, die mit den Lentiviren a) BMP2, b) Smad8 L+MH2 und BMP2 infiziert wurden. Es handelt sich um Tag 4 nach Infektion. Diese Zellen wurden für die Implantationen verwendet. Vergrößerung 10x .....	81
<b>Abbildung 43:</b> BMP2-abhängige Differenzierung der humanen MSCs in Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin). a) subkutan; b) intramuskulär. K = Knochen, zum Teil mineralisiert .....	82
<b>Abbildung 44:</b> Nachweis der humanen MSCs im neu gebildeten Knochengewebe .....	83
<b>Abbildung 45:</b> Smad8 L+MH2/BMP2-abhängige Differenzierung der humanen MSCs in sehn-ähnliches- und Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin). .....	84
<b>Abbildung 46:</b> Nachweis des neugebildeten Sehngewebes nach 4 wöchiger Implantationszeit.....	85
<b>Abbildung 47:</b> Anordnung der in den C3H10T1/2 <sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> -exprimierenden Gene in Cluster .....	89
<b>Abbildung 48:</b> Nachweis der Proteinexpression von Periostin in C3H10T1/2 <sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2 <sub>Smad8L+MH2/BMP2</sub> -Zellen mittels Western Blot .....	90
<b>Abbildung 49:</b> Northern Blot; Expression von Periostin in C3H10T1/2 <sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2 <sub>BMP2/Smad8L+MH2</sub> -Zellen an vier verschiedenen Zeitpunkten während einer Differenzierungsstudie.....	91
<b>Abbildung 50:</b> Relative Periostin-Konzentration (RNA) in den C3H10T1/2 <sub>BMP2</sub> (grün) und C3H10T1/2 <sub>BMP2/Smad8L+MH2</sub> -Zellen (orange). .....	92
<b>Abbildung 51:</b> Nachweis der Infektionseffizienz der Lentiviren anhand der Expression des eingebrachten GFP-Lentivirus .....	95
<b>Abbildung 52:</b> Expression bestimmter Markergene während der Differenzierung lentiviral infizierter C3H10T1/2-Zellen mit 1) GFP, 2) GFP und BMP2, 3) Periostin und 4) Periostin und BMP2 ...	96
<b>Abbildung 53:</b> C3H10T1/2 lentiviral-infizierte Zellen mit a) Periostin und GFP b) Periostin, caBMPR-IA und GFP, c) GFP .....	98
<b>Abbildung 54:</b> GFP-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin).....	99
<b>Abbildung 55:</b> Periostin/caBMPR-IA-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin) .....	100
<b>Abbildung 56:</b> Periostin/BMPR-IA-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation. (Trichrom und Masson Goldner) .....	102
<b>Abbildung 57:</b> Humane mesenchymale Stammzellen lentiviral infiziert mit a) Periostin und GFP, b) Periostin, caBMPR-IA und GFP, c) GFP .....	103
<b>Abbildung 58:</b> Differenzierung von humanen MSCs nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin). .....	104
<b>Abbildung 59:</b> Periostin/caBMP-IA-abhängige Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin- und Eosin).....	105
<b>Abbildung 60:</b> Vergleich zweier intramuskulärer Schnittpräparate nach einer Hämatoxylin- und Eosin Färbung und einer immunhistochemischen Färbung mit einem <i>Kollagen Typ III</i> - und GFP-Antikörper. 106	
<b>Abbildung 61:</b> Schnittpräparat eines implantierten Schwammes mit Periostin- und caBMPR-IA-lentiviral infizierten humanen Stammzellen .....	107
<b>Abbildung 62:</b> Nachweis von <i>Kollagen Typ III</i> und GFP im Zentrum des Implantates. ....	108
<b>Abbildung 63:</b> Nachweis von <i>Kollagen Typ III</i> und GFP am Rand des Implantates. ....	108
<b>Abbildung 64:</b> Identifizierung der sehn-ähnlichen Struktur durch Fluoreszenz-Färbung .....	109
<b>Abbildung 65:</b> Verwendete Molekulargewichtsmarker. ....	127
<b>Abbildung 66:</b> Plasmidkarte und MCS (multiple cloning site) von pShuttle.....	128
<b>Abbildung 67:</b> Plasmidkarte von Adeno-X.....	128
<b>Abbildung 68:</b> Plasmidkarte von pLox .....	129
<b>Abbildung 69:</b> pHRTK-Vektor .....	129
<b>Abbildung 70:</b> Anordnung der in den C3H10T1/2 <sub>BMP2</sub> -exprimierenden Gene in Cluster.. .....	130

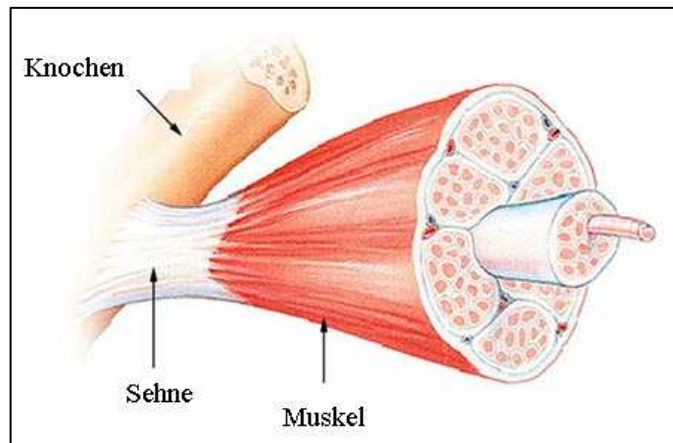
## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die Syntheseprodukte von Tenozyten .....	8
<b>Tabelle 2:</b> Marker, die während der embryonalen Entwicklung in Sehnen exprimiert werden .....	11
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete primäre Antikörper im Western Blot .....	36
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete sekundäre Antikörper im Western Blot.....	36
<b>Tabelle 5:</b> Titer der adenoviralen Isolate [Plaque bildende Einheiten/ml] .....	68
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht über die Differenzierungsstudien nach adenoviraler Infektion von C3H10T1/2-Zellen...	70
<b>Tabelle 7:</b> Schema der Infektionen von C3H10T1/2-Zellen mit adenoviralen Konstrukten für ektopische Implantationen in C3H/HeN-Mäuse.....	73
<b>Tabelle 8:</b> Titer der lentiviralen Isolate [Plaque bildende Einheiten/ml].....	80
<b>Tabelle 9:</b> Infektionsschema der Zellen für Implantationsversuche.....	81
<b>Tabelle 10:</b> Darstellung der Microarray Ergebnisse in Form einer Genliste .....	87
<b>Tabelle 11:</b> Ergebnisse der Real-Time PCR vom HPRT-Ableich und von der Periostin-Expression in C3H10T1/2 <sup>BMP2/Smad8L+MH2</sup> - Zellen .....	92
<b>Tabelle 12:</b> Titer der lentiviralen Isolate [Plaque bildende Einheiten/ml].....	93
<b>Tabelle 13:</b> Infektion von C3H10T1/2-Zellen mit den Lentiviren GFP (Kontrolle), BMP2, Periostin und Periostin/BMP2 .....	94
<b>Tabelle 14:</b> Infektionsschema der Zellen für Implantationsversuche.....	97
<b>Tabelle 15:</b> Infektionsschema für Implantationsversuche mit lentiviral-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen .....	103
<b>Tabelle 16:</b> Verwendete Enzyme .....	125
<b>Tabelle 17:</b> Verwendete Chemikalien .....	125
<b>Tabelle 18:</b> Verwendete murine Primer .....	126
<b>Tabelle 19:</b> Verwendete murine Primer für Real Time PCR.....	127
<b>Tabelle 20:</b> Verwendete Plasmide .....	127

# 1 Einleitung

## 1.1 Sehnen

Sehnen (lateinisch: tendo) zählen neben anderen Geweben wie zum Beispiel dem Knorpel- und Knochengewebe zum Bindegewebe. Sie verbinden Knochen und Muskel oder Muskelbäuche untereinander und sind dadurch in der Lage, die Kraft der Muskelkontraktion auf das Skelett zu übertragen (Abbildung 1). Durch diesen Prozess wird eine Gelenkbewegung erst ermöglicht.



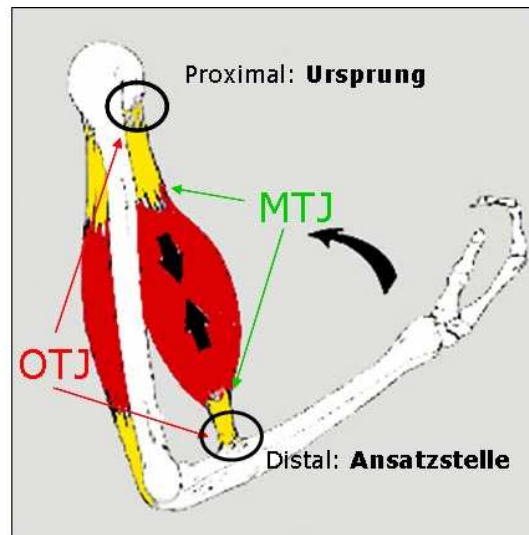
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung einer Sehnenverbindung mit einem Muskel und einem Knochen.

Die Sehnen des Bewegungsapparates weisen durch spezifische Belastungsmuster eine sehr komplexe Morphologie auf, die sich in den einzelnen Gelenken deutlich unterscheidet. Hinzu kommt der altersbedingte biomechanische Verlust in den einzelnen Sehnenabschnitten.

Da die Funktion der Sehne sehr komplex ist, ist ein tief greifendes Verständnis der Generierung und des Aufbaus von Sehnen wichtig, um die Pathogenese von verletzten und erkrankten Sehnen besser verstehen und behandeln zu können.

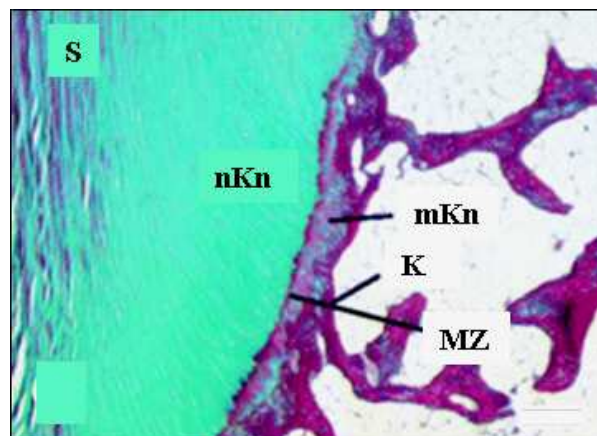
### 1.1.1 Makroskopischer Aufbau von Sehnen

Ein Muskel hat grundsätzlich zwei Sehnen, wobei sich eine distal und eine proximal befindet. Die Anhaftung der proximalen Sehne eines Muskels an den Knochen wird als Muskelursprung bezeichnet und die Anhaftung der distalen Sehne eines Muskels an den Knochen als Muskelansatzstelle oder Insertion. Die Verbindungsstelle von einer Sehne zu einem Muskel wird Muskel-Sehnen-Übergang (Enthese bzw. „Myotendinous Junction“ oder MTJ) und die Verbindung von einer Sehne zu einem Knochen Knochen-Sehnen-Übergang (Osteotendinous Junction“ oder OTJ) genannt (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Übersicht der Verbindung von Sehnen mit Muskeln und Knochen. OTJ = Knochen-Sehnen-Übergang („Osteotendinous Junction“); MTJ = Muskel-Sehnen-Übergang („Myotendinous Junction“). (Verändert nach Józsa und Kannus, 1997)

Generell erfolgt die Verbindung von Sehnen und Bändern mit dem Knochen über Ansatzzonen, die in ihrer Struktur von der Art der Knochenbildung abhängig sind (Biermann, 1957; Künzle und Knospe, 1990). Bei einer periostdiaphysären Ansatzzone inserieren die Sehnen und Bänder am Periost oder über Sharpeysche Fasern im Knochen, der durch eine desmale Ossifikation entsteht. Bei einer apophysären (auch chondroapophysär genannt) Sehnenansatzzone kommt es zu einer Insertionen von Sehnen an chondral präformierten Apophysen, sozusagen an Skelettabschnitten mit endochondraler Ossifikation (Tillmann, 1987). Des Weiteren unterscheidet sich die apophysäre Sehnenansatzzone von dem periostdiaphysären Typ durch seinen vierzonalen Aufbau am Knochen-Sehnen-Übergang: Sehne, nicht-mineralisierter Faserknorpel, mineralisierter Faserknorpel, Knochen (Abbildung 3).

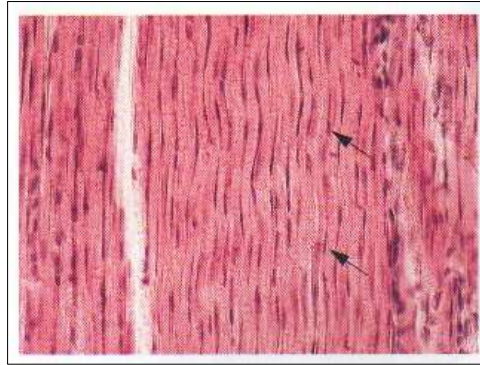


**Abbildung 3:** Typischer Aufbau eines Knochen-Sehnen-Überganges (apophysäre Sehnenansatzzone) mit seinen vier Zonen. S = Sehne; nKn = nicht-mineralisierter Faserknorpel; MZ = Mineralisierungszone; mKn = mineralisierter Faserknorpel; K = Knochen (M.Benjamin et al., 2006)

Je nach ihrer Funktion unterscheiden sich Sehnen in ihrem Aufbau. So können sie sehr breit und flach, aber auch zylinderförmig, fächer – oder bandförmig sein. Ihre Form hängt von der mechanischen Belastung ab. Muskeln, die feine und empfindliche Bewegungen ausführen müssen wie zum Beispiel die Finger-Beuge-Muskulatur, besitzen feine und dünne Sehnen. Muskeln, die starke Widerstandskräfte erzeugen müssen, haben breite und kurze Sehnen. Zu diesen Muskeln gehören unter anderem der Quadrizeps oder der Trizeps brachii Muskel.

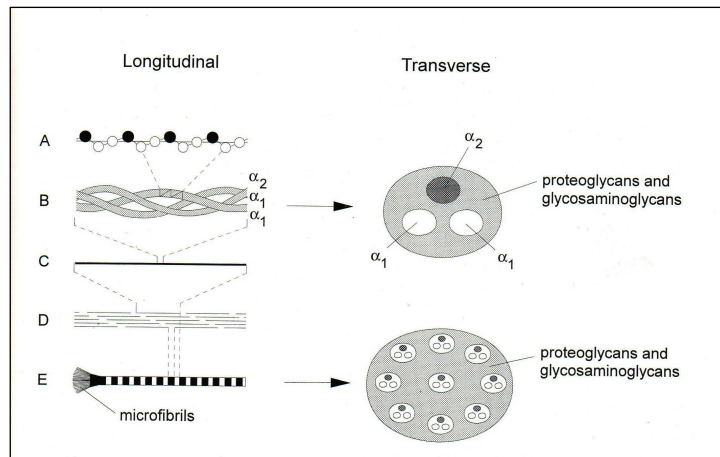
### 1.1.2 Mikroskopischer Aufbau von Sehnen

Wie alle Binde- und Stützgewebe bestehen Sehnen aus ortsständigen Zellen und einer Interzellularsubstanz, in die hauptsächlich kollagene Fasern eingelagert sind und die damit den Sehnen ihre Festigkeit gibt. Der Hauptbestandteil einer Sehne ist das Kollagen Typ I; es macht 65 bis 80% der Trockenmasse aus. Die Menge an Elastin beträgt 1 bis 2%. Diese beiden Bestandteile von Sehnen werden von Tenoblasten und Tenozyten produziert, bei denen es sich um lang gestreckte Fibroblasten und Fibrozyten handelt, die zwischen den Kollagenfasern liegen (Abbildung 4). Die Kollagenfasern sind in einer hierarchischen Struktur angeordnet und bilden so die komplette Sehne. Charakteristisch für Sehnenzellen ist ein wellenförmiger Verlauf, welcher als „crimp pattern“ bezeichnet wird.



**Abbildung 4:** Längs geschnittene Sehne eines Menschen. Die Pfeile (→) weisen auf die abgeflachten Kerne der Sehnenzellen (Fibrozyten der Sehne = Tenozyten) zwischen den leicht gewellt verlaufenden Kollagenfasern der Sehne. Färbung: H&E; Vergrößerung 250fach. (Welsch, 2006)

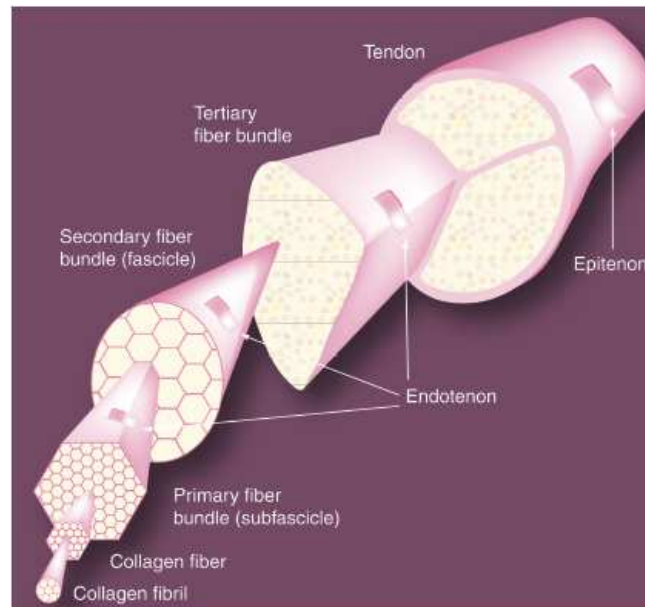
Der mikroskopische Aufbau einer Sehne ist komplex. Die erste elektronenmikroskopisch sichtbare Einheit ist die Kollagenfibrille (Abbildung 5). Hierbei lagern sich zunächst Aminosäuren zu einer  $\alpha$ -Helix zusammen, wobei an jeder dritten Stelle die Aminosäure Glycin zu finden ist (Abbildung 5 A). Drei dieser Ketten verbinden sich zu einer rechtsgewundenen Tripel-Helix, die von einer dünnen Schicht aus Proteoglykanen und Glykosaminglykanen umgeben ist (Abbildung 5 B). Die Tripelhelix wird auch als Prokollagen bezeichnet. Das Prokollagen wird intrazellulär in Fibrozyten aufgebaut und durch Exozytose sezerniert. Dabei werden die terminalen Peptide abgespalten. Die entstandenen Kollagenmoleküle lagern sich zu multimolekularen Aggregaten zusammen und werden untereinander quervernetzt, wobei eine Mikrofibrille entsteht. Innerhalb einer Mikrofibrille sind die Kollagen-Moleküle in Viererstapeln angeordnet, wobei jedes Kollagen-Molekül sein Nachbarmolekül um ein Viertel seiner Länge überlagert. Durch diese spezielle Anordnung entsteht das charakteristische, gebänderte Muster einer Mikrofibrille (Abbildung 5 E). Die Mikrofibrillen sind von Proteoglykanen und Glykosamio glykanen umgeben (Kannus, 2000).



**Abbildung 5:** Bildung der Kollagenfibrille. Longitudinal = Längsschnitt; Transverse = Querschnitt (Verändert nach Józsa und Kannus, 1997)

Die Mikrofibrillen lagern sich zu Kollagenfibrillen (Durchmesser 20nm bis 150nm) zusammen. Aus einem Bündel von Kollagenfibrillen wird die Grundeinheit einer Sehne, die Kollagenfaser (Durchmesser 1µm bis 50µm), gebildet. Diese Faser ist die kleinste, lichtmikroskopisch sichtbare Einheit und erstreckt sich von dem einem bis zum anderen Ende der Sehne. Eine feine Bindegewebshülle, das Endotenon, umgibt jede Kollagenfaser und hält die Fasern in übergeordneten Strukturen zusammen. Das Endotenon besteht aus einer dünnen, netzartigen Struktur von Bindegewebe. Es erlaubt den Faserbündeln, gegeneinander zu gleiten. Des Weiteren enthält das Endotenon Nervenfasern, Blut- und Lymphgefäße. Einzelne Kollagenfibrillen lagern sich zunächst zu Fasern und schließlich zu primären Faserbündeln (engl. subfascicle, Durchmesser 15µm bis 400µm) zusammen. Diese lagern sich wiederum zu einem sekundären Faserbündel (engl. fascicle, Durchmesser 150µm bis 1500µm) zusammen. Mehrere sekundäre Faserbündel bilden das teritiäre Faserbündel (Durchmesser 1000µm bis 3000µm). Teritiäre Faserbündel schließen sich spiralförmig zur endgültigen Sehne zusammen (Durchmesser 2000µm bis 12mm). Sie ist von einem Epitenon umgeben. Das Epitenon ist ein relativ dichtes Netzwerk aus Kollagenfibrillen, die sowohl quer als auch längs verlaufen (Kannus, 2000), das ein Auffasern des Bindegewebes unter mechanischer Beanspruchung verhindert (Zschäbitz, 2005; Benjamin und Ralphs, 2000). Der hierarchische Aufbau der Sehnenstruktur ist in Abbildung 6 dargestellt.

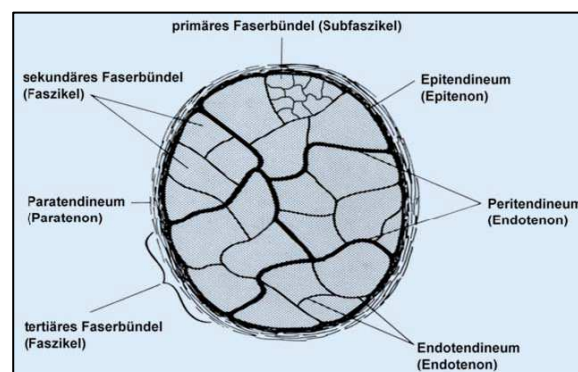




**Abbildung 6:** Hierarchischer Aufbau der Sehnenstruktur von der Kollagenfibrille bis zur vollständigen Sehne. (Hoffmann et al., 2006)

Sehnen mit einem geringeren Bewegungsumfang werden außerdem von einer lockeren, gut vaskularisierten Bindegewebsschicht umgeben, dem Paratenon (Abbildung 7). Dieses kann bei langen Sehnen mehrere mit Flüssigkeit angefüllte Gleitschichten aufweisen. Sehnen mit einem langen Bewegungsumfang werden häufig von einer doppelwandigen Röhre, der Sehnenscheide umgeben, deren innere Wand mit dem Epitenon der Sehne verwachsen ist und ihrer Bewegung folgt. Die äußere Wand der Sehnenscheide ist mit dem Bindegewebe der Umgebung verbunden. Am Ende der Röhre der Sehnenscheide geht die innere Wand in die äußere über (Sehnenscheidenpforte). Der Raum zwischen innerer und äußerer Wand wird von Synovia ausgefüllt, die der Gelenkflüssigkeit ähnelt und die Reibung der Sehne bei Bewegung herabsetzt (Welsch, 2006). Die Synovia dient nicht nur als Gleitmittel, sondern auch als Ernährung der Tenozyten (Zschäbitz, 2005; Józsa und Kannus, 1997).

Beide Strukturen dienen der Reduktion der Reibung und ermöglichen eine freie Bewegung der Sehne gegen das umliegende Gewebe (Kannus, 2000).



**Abbildung 7:** Schematischer Querschnitt durch eine Sehne. (Zschäbitz, 2005)

Erst durch ihre komplexe Mikro- und Makrostruktur können Sehnen ihre Funktion ausführen und die im Muskel erzeugte Kraft auf das Skelett übertragen. Während verschiedener Bewegungsphasen werden die Sehnen sowohl longitudinalen als auch transversalen Kräften ausgesetzt. Außerdem müssen sie direkten Drücken standhalten können. Dieses wird gewährleistet, indem die beschriebene dreidimensionale Struktur der Fasern einer Sehne ein

Puffermedium gegen Kräfte, die aus verschiedenen Richtungen kommen, bildet. So wird eine Verletzung oder Trennung der Fasern verhindert.

Im Ruhezustand zeigen Sehnen einen charakteristischen leicht gewellten Verlauf der Kollagenfasern. Bis zu einer Dehnung von etwa 4% zeigt das Sehnengewebe die Eigenschaft der Viskoelastizität. Das bedeutet, dass nach Beendigung der Krafteinwirkung die ursprüngliche Morphologie der Sehne mit ihrer wellenförmigen Konfiguration wieder hergestellt wird. Bei Dehnungen von über 4% kommt es in den Kollagenfasern zu Mikrorupturen, wodurch das Gewebe vermindert belastbar wird und sich plastisch verformt. Wird eine akute Überbelastung der Sehne herbeigeführt, die zu einer Verlängerung von 8% und mehr führt, kann die Sehne reißen (Zschäbitz, 2005).

Der komplexe histologische Sehnenaufbau dämpft also die Wirkung abrupter Muskelkontraktionen ab und trägt wesentlich zu einem flüssigen Bewegungsbild bei. Die Sehne dient der Speicherung von kinetischer Energie, insbesondere an der unteren Extremität, wie zum Beispiel bei der Achillessehne. Ihre spezifische Speicherkapazität soll dabei um den Faktor 400-1800 höher liegen als bei Muskelgewebe. Die gespeicherte Bewegungsenergie im Gewebe der Achillessehne soll zwischen 20% und 40% liegen. Diese Funktion der Speicherung ist in den Sehnen der oberen Extremitäten nicht vorhanden. Dadurch lassen sich die deutlichen Unterschiede in der Zusammensetzung und damit der Biomechanik der einzelnen Sehnen erklären (Zschäbitz, 2005).

### 1.1.3 Extrazelluläre Sehnenmatrix

Wie erwähnt, dienen Sehnen der Kraftübertragung der Muskeln auf die Knochen und ermöglichen so die Beweglichkeit der Gelenke. Für diese Funktion müssen sie eine hohe Zugfestigkeit, hohe mechanische Stabilität, aber auch elastische Eigenschaften aufweisen. Verantwortlich für diese Eigenschaften ist die ausgedehnte extrazelluläre Sehnenmatrix. Sie bildet ein dreidimensionales Netzwerk, welches aus Kollagen, Elastin, einer sogenannten Grundsubstanz sowie anorganischen Komponenten besteht.

Den Hauptbestandteil der Kollagenfasern bildet das Kollagen Typ I (65 bis 80% der Trockenmasse einer Sehne). Daneben gibt es wenig Kollagen Typ III und Kollagen Typ V.

Die elastischen Fasern machen nur 1 bis 2% der Trockenmasse einer Sehne aus. Die Funktion von elastischen Fasern ist zwar noch nicht endgültig geklärt, aber es wird davon ausgegangen, dass sie dazu beitragen, die wellenförmige Konfiguration der Kollagenfasern nach einer Muskelkontraktion und Streckung der Sehne wieder herzustellen (Kannus, 2000).

Die Grundsubstanz der extrazellulären Sehnenmatrix besteht aus einem hydrophilen Gel, welches die kollagenen und elastischen Fasern umgibt. Es besteht aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen, Struktur-Glykoproteinen und vielen anderen kleinen Molekülen.

Der Wasseranteil einer Sehne liegt bei 65 bis 75%, wobei ein Großteil des Wassers mit Proteoglykanen assoziiert ist (Benjamin und Ralphs, 1997). Durch die sehr hohe Kapazität der Wasserbindung der Makromoleküle (Proteoglykane und Glykosaminoglykane) werden die biomechanischen Eigenschaften wie zum Beispiel die Elastizität der Sehne gegenüber Scher- und Druckkräften verbessert. Die in Sehnen vorkommenden Glykosaminoglykane sind Dermatan sulfat, Chondroitin sulfat, Hyaluronsäure und Heparan sulfat (Kannus, 2000). Zu den Glykoproteinen gehören unter anderem Fibronectin, Thrombospondin, Tenascin-C und Laminin (Kannus, 2000).

Anorganische Komponenten bilden weniger als 0,2% der Trockenmasse einer Sehne. Sie kommen aber in Sehnen in einer großen Vielfalt vor. In der höchsten Konzentration wurde Kalzium mit 0,001 bis 0,01% der Trockenmasse gefunden. Andere nachgewiesene

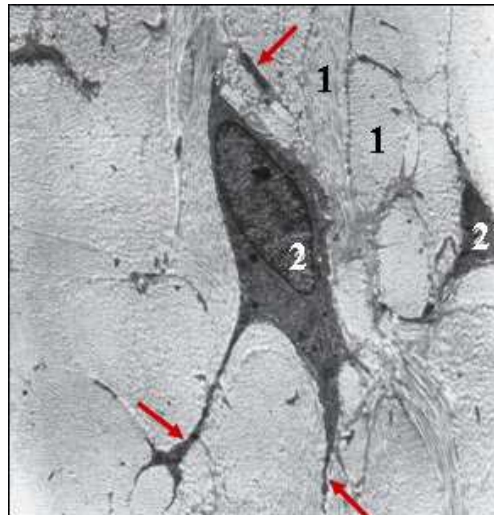
Komponenten sind Magnesium, Mangan, Cadmium, Kobalt, Kupfer, Zink, Nickel, Lithium, Fluorid, Phosphor, Silikon und Blei. Diese Spurenelemente kommen gewöhnlich in Konzentrationen von 0,02 bis 120ppm im Sehngewebe vor und sind involviert in das Wachstum, die Entwicklung und den normalen Metabolismus muskuloskeletaler Strukturen. Kupfer spielt zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Bildung von Kollagenquervernetzungen und Kalzium nimmt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Knochen-Sehnen-Übergangs ein. Allerdings sind die biochemischen und funktionellen Aufgaben vieler im Sehngewebe vorkommender Spurenelemente zurzeit noch nicht geklärt.

#### **1.1.4 Sehnenzellen (Tenoblasten und Tenozyten)**

Den zellulären Anteil der Sehne bilden die Sehnenzellen (Tenoblasten und Tenozyten). Sie machen etwa 90 bis 95% aus. Die anderen 5 bis 10% bestehen aus Chondrozyten, synovialen und vaskulären Zellen. Sehnenzellen sind zwischen den Kollagenfasern angeordnet. Sie synthetisieren die Komponenten der extrazellulären Sehnenmatrix und haben somit eine zentrale Bedeutung bei der Erneuerung (Remodelling) der Matrix und folglich der Funktionstüchtigkeit der gesamten Sehne (Józsa et al., 1991; Benjamin und Ralphs, 2000; Kannus, 2000).

In einer neugeborenen Sehne existiert ein hohes Zell-Matrix-Verhältnis. Die Zellen (Tenoblasten; Länge 20 bis 70µm, Breite 8 bis 20µm) liegen zunächst in langen parallelen Ketten und haben unterschiedliche Formen und Größen. Im Laufe der Entwicklung verringert sich das Zell-Matrix-Verhältnis, die Tenoblasten beginnen sich zu ähneln und werden spindelförmig. Im adulten Zustand entwickeln sich die Tenoblasten zu lang gestreckten Tenozyten mit einem Durchmesser von 80 bis 300µm (Kannus, 2000).

Tenozyten sind lang gestreckte spindelförmige Zellen mit langen Fortsätzen (Abbildung 8), durch die der Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakt vermittelt wird (Benjamin und Ralphs, 2000; Kannus 2000). Aufgrund ihrer charakteristischen Form werden sie auch als Flügelzellen bezeichnet. Zellform und Zellfortsätze sind von besonderer Wichtigkeit, da unter physiologischen Bedingungen die Zelldichte in der Sehne insgesamt gering ist und der essentielle Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakt trotz wachsender Matrix auf diese Weise gewährleistet ist. Sehnenzellen bilden über Fortsätze ein kommunizierendes Netzwerk in der Sehne. Der Informationsaustausch zwischen den Zellen bzw. Zellfortsätzen wird über sogenannte „gap junctions“ vermittelt (Ralphs et al., 1998; Benjamin und Ralphs, 2000; Kannus, 2000). Die hohe metabolische Aktivität der Tenozyten wird bei der ultrastrukturellen Analyse durch ein gut ausgebildetes raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) und zahlreiche Golgi-Apparate deutlich. Mitochondrien sind in kleiner Zahl vorhanden, zeigen aber eine definierte Kristall-Struktur (Benjamin und Ralphs, 2000; Kannus, 2000).



**Abbildung 8:** Ultrastruktur einer Sehne aus einer Ratte, die quer geschnitten wurde. (1) Bündel von Kollagenfibrillen, die überwiegend quer getroffen sind; (2) Sehnenzelle (Tenozyt) mit schlanken Fortsätzen (→). Vergrößerung 7680fach. (Welsch, 2006)

Dieser ultrastrukturelle Aufbau spiegelt die hohe Synthesekapazität der Tenozyten wider (Tabelle 1). Sie sind für die Herstellung sämtlicher Matrixbestandteile verantwortlich und legen außerdem die Anordnung der Kollagenfaserbündel fest (Benjamin und Ralphs, 2000; Kannus 2000).

**Tabelle 1:** Übersicht über die Syntheseprodukte von Tenozyten (Zschäbitz, 2000)

Wichtige Syntheseprodukte der Tenozyten			
Substanzgruppe	Relativer Anteil gesamt [%] <sup>a</sup>	Substanz	Relativer Anteil [%] <sup>a</sup>
Kollagene	80–90	• Kollagen Typ I	65–85
		• Kollagen Typ II	0,2–1,8
		• Kollagen Typ III	0,8–1,8
Elastische Fasern	1–2	• Elastin	1–2
Proteoglykane <sup>b</sup>	0,2–3,5	• Dermatan sulfat	
		• Chondroitin sulfat	
		• Aggrecan	
		• Decorin	
Bindungsproteine	1–4	• Integrine	
		• Laminin	
		• Fibronectin	
		• Thrombospondin	
Wachstumsfaktoren		• FGF	
		• PDGF	
Weitere Faktoren		• Prostaglandine	
		• NO	

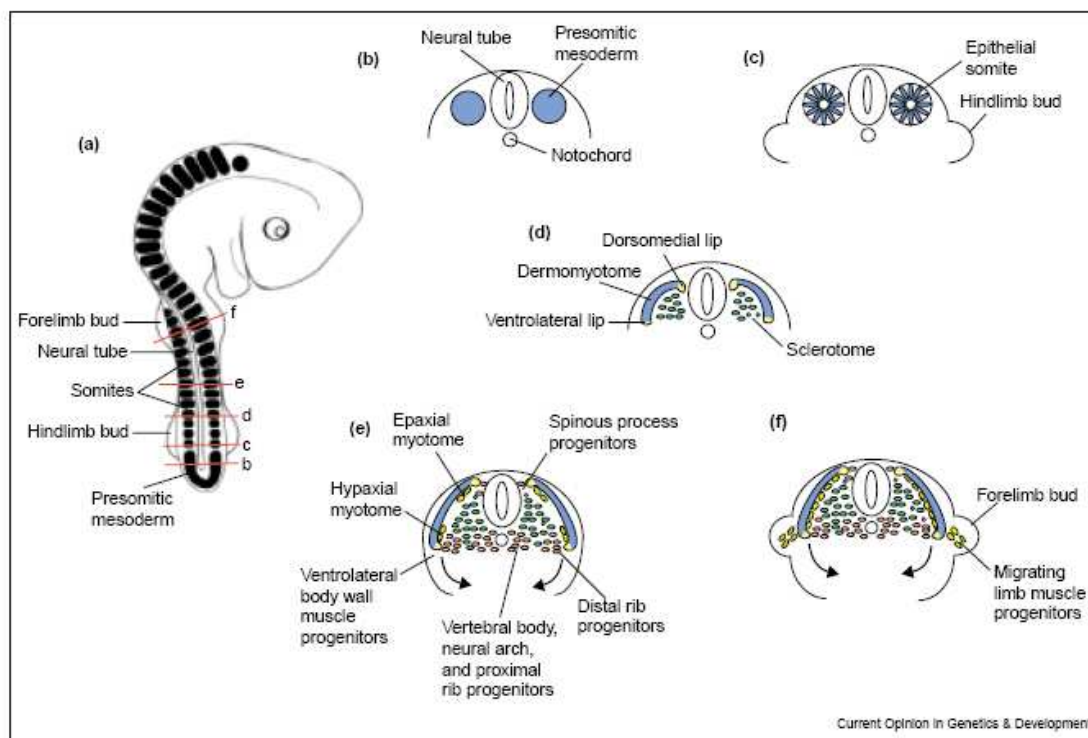
<sup>a</sup>In der Trockenmasse der Extrazellulärsubstanz  
<sup>b</sup>FGF fibroblast growth factor, PDGF platelet derived growth factor, NO Stickstoffmonoxid

## 1.2 Embryonale Entwicklung und Differenzierung von Sehnen

Die Entwicklung zu Sehnen und Bändern ist ein komplexer Vorgang, über den bisher nur wenig bekannt ist.

Nach der Bildung des dritten Keimblattes, dem Mesoderm, bilden sich aus dem paraxialen Mesoderm die Somiten (Abbildung 9). Ein Somit ist ein sogenanntes Ursegment, das

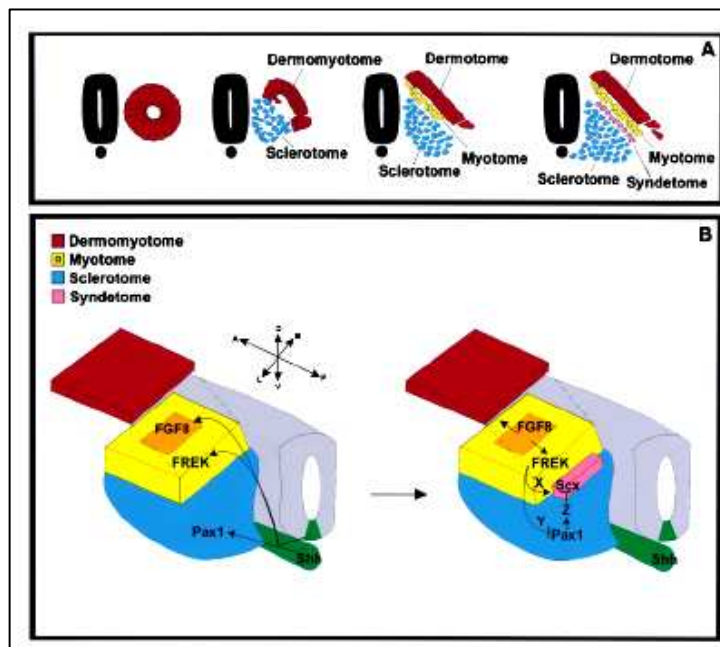
vorübergehend in der embryonalen Entwicklung der Wirbeltiere auftritt. Die Somiten werden in Kopf-Fuß-Richtung (kraniokaudal) aus dem Mesoderm seitlich der Mittellinie abgeschnürt. Sie liegen daher in zwei Strängen rechts und links der axialen Strukturen Chorda dorsalis und des Neuralrohrs. Der Somit besteht zunächst aus einem Epithel mit einem mesenchymalen Hohlraum, der als Somitozöl bezeichnet wird. Der laterale Teil des Mesoderms wird als Seitenplatte und der zwischen dem paraxialen Mesoderm und der Seitenplatte gelegene Teil des Mesoderms als intermediäres Mesoderm bezeichnet. Als Antwort auf sekretierte Signale vom umliegenden Gewebe entwickelt sich der ventromediale Anteil mesenchymal und wird als Sklerotom bezeichnet. Der dorsolaterale (zum seitlichen Rücken gerichtete), epithelial gebliebene Anteil, wird Dermamyotom genannt. Aus dem Sklerotom gehen die Wirbelsäule, die Rippen, die Sehnen und die Hirnhaut hervor (Kalcheim und Ben-Yair, 2005). Dagegen entwickeln sich aus dem Dermamyotom die Muskeln der Wirbel und der Extremitäten, die Haut, Knorpel des Schulterblattes sowie die Endothelzellen (Kalcheim und Ben-Yair, 2005).



**Abbildung 9:** Überblick über die Bildung und Kompartimentierung eines 3-Tage alten Hühnerembryos. (a) Somitenknospen (schwarz) vom kranialen Ende des prä-somitischen Mesoderms (PSM), das zu beiden Seiten des Neuralrohrs liegt. Die Bildung und Reifung der Somiten findet in einem kraniokaudalen Gradienten statt. (b-f) Querschnitte durch den Embryo an den angegebenen axialen Ebenen. (b) Schnitt in der Ebene des PSM (blau). (c) Schnitt durch die gerade entstandenen Somiten (blau) in der Ebene der hinteren Extremitäten. (d) Entstehung des Sklerotoms (grün) und des Dermamyotoms (blau). (e) Bildung des Myotoms (gelb), das die Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur enthält. (f) Auf der Ebene der Extremitätenknospe lösen sich Zellen des Dermatons (gelb) und wandern in das laterale Plattenmesoderm ein. Dort bilden sie die Extremitäten und die umgebenden Muskeln. (Brent und Tabin, 2002)

Bei der Untersuchung des Expressionsmusters des Transkriptionsfaktors *Scleraxis* (*scx*) wurde ein weiteres Kompartiment entdeckt, das zwischen dem Myotom und dem Sklerotom liegt und als Syndetom bezeichnet wird. Dieses entsteht nach myotomalen Signalen durch Teilung des Sklerotoms in das ventrale Sklerotom und in das dorsale Syndetom (Abbildung 10 A). Es wurde gezeigt, dass die Zellen des Syndetoms von dem dorsolateralen Bereich des frühen Sklerotoms abstammen und später in Sehnen differenzieren. Dabei gibt es keine Überlappung der Expression von myotomalen (*myoD*) und sklerotomalen (*pax1*) Markern und *Scleraxis*, das ausschließlich im Syndetom exprimiert wird (Brent et al., 2003).

Ein Modell zur Bildung des Syndetoms wurde von Brent et al. postuliert (Abbildung 10). Es basiert auf einer Interaktion zwischen dem Myotom und Sklerotom. In dem Modell wird gezeigt, dass sonic hedgehog (shh), das von der Chorda dorsalis und der frühen Bodenplatte (Abbildung 10 B, grün) sekretiert wird, während der frühen Somitenentwicklung (Abbildung 10 B, links) sowohl den Pax1- als auch den FGF/FREK-Signalweg des Myotoms induziert. Während der weiteren Entwicklung des Somiten aktiviert ein FGF-Signal (Abbildung 10 B, orange), das vom Zentrum des Myotoms ausgeht, die FREK-exprimierenden Zellen, die an den posterioren und anterioren Randbereichen des Myotoms lokalisiert sind (Abbildung 10 B, gelb). Diese wiederum aktivieren die *Scleraxis*-Expression im angrenzenden Sklerotom über ein zweites Signal, den Faktor X. Bei diesem Vorgang wird davon ausgegangen, dass die – über FGF-8 induzierte – FREK-Domäne auf das Myotom begrenzt ist und nur das Myotom das hypothetische zweite Signal produzieren kann. Durch die aktivierte Expression von *Scleraxis* bildet sich dann das Syndetom (Abbildung 10 B, rosa). Das im Sklerotom exprimierte *pax1*, welches ein Schlüsselregulator bei der Entwicklung des axialen Skeletts darstellt, reprimiert hingegen *Scleraxis* durch einen unbestimmten Faktor Z. Diesem Effekt wird aber durch das FGF/FREK-Signalling über einen weiteren unbekannten Faktor Y entgegengewirkt (Brent et al., 2003).



**Abbildung 10:** Modell der Bildung des Syndetoms. (Brent et al., 2003)

(A) Entstehung der somatischen Kompartimente. Epithelialer Somit/ Dermomyotom/ Dermotom: rot; Sklerotom blau; Myotom: gelb; Syndetom: rosa; Neuralrohr/Chorda dorsalis: schwarz.

(B) Überblick über die Signale, die bei der Bildung des Syndetoms involviert sind: FGF8 (fibroblast growth factor 8), FREK (FGF-Rezeptor), Scx (Scleraxis), Shh (Sonic hedgehog), Pax1. Chorda dorsalis, Bodenplatte: grün; Neuralrohr: grau; Sklerotom: blau; Myotom: gelb-orange; Dermomyotom: rot; Syndetom: rosa; ↔: anterior-posterior (A,P), dorsal-ventral (D,V) und medial-lateral (M,L) Achse.

Es wurde gezeigt, dass Sehnen, die mit dem Muskel der Wirbelsäule der Vertebraten verbunden sind, von den Somiten stammen, wohingegen sich die Sehnen der Extremitäten vom lateralen Plattenmesoderm aus entwickeln (Schweitzer et al., 2001). Obwohl die Entwicklung von Sehnen sowohl in den Gliedmaßen als auch in den Somiten eng mit der Entwicklung von Muskeln verknüpft ist, existiert doch ein wesentlicher Unterschied: In den proximalen Gliedmaßen können sich Sehnen- und Muskelvorläuferzellen unabhängig voneinander entwickeln, obwohl sie sich in direkter räumlicher Nähe befinden und die entwickelten Muskeln und Sehnen später dann auch miteinander interagieren (Kardon, 1998). In den Somiten scheint es hingegen so zu sein, dass die Bildung und Differenzierung von



Sehnenvorläuferzellen (Syndetom) die Anwesenheit eines differenzierten Myotoms benötigt (Brent et al., 2003).

### 1.2.1 Molekulare Marker während der Differenzierung von Sehnen

Bisher wurde eine Reihe von molekularen Markern beschrieben, die mit der Differenzierung von Sehnen in Einklang gebracht werden. Ihre Spezifität in Hinsicht auf die Tendogenese ist jedoch unzulänglich, da viele dieser Marker oftmals auch in anderen Geweben exprimiert werden. Hinzu kommt, dass die Expression der Marker meist auf ein bestimmtes Entwicklungsstadium der Sehnen begrenzt ist, wodurch ein Nachvollziehen der sukzessiven Sehnenentwicklung erschwert wird. Ebenfalls sind die Auswirkungen der Expression der Markermoleküle auf die Sehnenentwicklung nur unzureichend geklärt.

Über die Differenzierung der frühen Sehnen ist bisher nur wenig bekannt. Daher ist die Identifizierung und Charakterisierung von Markergenen von großer Bedeutung.

**Tabelle 2:** Marker, die während der embryonalen Entwicklung in Sehnen exprimiert werden (Edom-Vovard und Duprez, 2003)

Type of molecules	Names	References reporting tendon location	Phenotypes of the available deficient mice
Extracellular matrix molecules	Collagens		
	Type I collagen	Chick (Hurle et al., 1989; Birk and Mayne, 1997), mouse (Niederreither et al., 1995), human (Waggett et al., 1998)	E12 death due to vascular defects (Lohler et al., 1984)
	Type III collagen	Chick (Birk and Mayne, 1997), mouse (Niederreither et al., 1995)	Abnormal type I collagen fibrillogenesis (Liu et al., 1997)
	Type V collagen	Chick (Birk and Mayne, 1997), mouse (Imamura et al., 2000)	Abnormal type I collagen fibrillogenesis (Andrikopoulos et al., 1995)
	Type VI collagen	Chick (Ros et al., 1995), mouse (Watanabe et al., 1997)	Muscle phenotype similar to Bethlem myopathy (Bonaldo et al., 1998)
	Type XII Collagen	Chick (Wälchli et al., 1994; Zhang et al., 2003) and mouse (Oh et al., 1993)	n.a.
	Type XIV Collagen	Chick (Wälchli et al., 1994; Young et al., 2000)	n.a.
	Proteoglycans		
	Biglycan	Mouse (Ameye et al., 2002), human (Waggett et al., 1998)	Abnormal collagen fibrillogenesis in tendons, osteoarthritis (Ameye et al., 2002)
	Decorin	Chick (Birk et al., 1995), mouse (Danielson et al., 1997), human (Waggett et al., 1998)	Abnormal collagen fibrillogenesis in skin and tendons (Danielson et al., 1997)
	Fibromodulin	Chick (Nurinskaya and Birk, 1996), mouse (Svensson et al., 1999), human (Waggett et al., 1998)	Abnormal collagen fibrillogenesis in tendons (Svensson et al., 1999)
	Lumican	Mouse (Ezura et al., 2000), human (Waggett et al., 1998)	Abnormal collagen fibrillogenesis in skin, cornea and early tendons (Chakravarti et al., 1998)
	Elastic matrix components		
	Elastin	Chick (Ros et al., 1995)	Vascular phenotype (Li et al., 1998)
Growth factors and antagonists	Emilin	Chick (Ros et al., 1995)	n.a.
	Fibrillin-1	Chick (Ros et al., 1995), human (Reinhardt et al., 1996)	Marfan syndrome-like phenotype (Pereira et al., 1999)
	Glycoproteins		
	Tenascin-C	Chick (Ros et al., 1995)	Widespread defects (Mackie and Tucker et al., 1999)
	Bmp4	Chick (D'Souza and Patel, 1999)	E9 death (Winnier et al., 1995)
	Fgf8	Chick (Edom-Vovard et al., 2001a)	Early death (Meyers et al., 1998)
	Fgf18	Chick (Ohuchi et al., 2000)	Bone phenotype (Ohbayashi et al., 2002; Liu et al., 2002)
	Follistatin	Chick (D'Souza and Patel, 1999)	Multiple defects and perinatal death (Matzuk et al., 1995)
	Tgfβ2	Chick (Merino et al., 1998) and mouse (Pelton et al., 1989)	Widespread defects including vascular but tendon not reported (Dunker and Kriegstein, 2000)
			Gross motor dysfunction (Dottori et al., 1998)
Transmembrane proteins	Eph-A4	Chick (Patel et al., 1996)	n.a.
	Tenomodulin	Mouse (Brandau et al., 2001)	n.a.
Transcription factors	Teneurin-2	Chick (Tucker et al., 2001)	n.a.
	Scleraxis	Chick and mouse (Schweitzer et al., 2001)	E8.5 death (Brown et al., 1999)
	Eya1, Eya2	Mouse (Xu et al., 1997)	Craniofacial abnormalities (Xu et al., 1999)
	Six2	Mouse (Oliver et al., 1995)	n.a.
	Zfhx1a (sEF1)	Chick and mouse (Tylzanowski et al., 2003)	Skeletal defects (Tagaki et al., 1998)

<sup>a</sup>Listed are the main, known tendon markers during embryonic development but is not exhaustive. E, embryonic day; n.a., not available.

#### 1.2.1.1 Extrazelluläre Matrixmoleküle

Den Hauptanteil der extrazellulären Matrix (ECM) bildet das Kollagen (siehe Tabelle 2). Die Komponenten der ECM von sich entwickelnden Sehnen wurden bereits durch Studien an Kollagen-Fibrillogenese intensiv untersucht (Canty und Kadler, 2002). Dabei wurde gezeigt, dass das Kollagen vom Typ I (Hurle et al., 1989; Birk und Mayne, 1997; Niederreither et al., 1995) den Hauptbestandteil von voll entwickelten Sehnen darstellt. Allerdings kommt dieses

Protein auch in anderen extrazellulären Matrices vor, so dass es nicht sehnenpezifisch ist. Es wird zum Beispiel ebenfalls von Fibroblasten der Haut und der Kornea oder von Osteoblasten synthetisiert. Die weiteren Bestandteile der ECM von Sehnen setzen sich aus Kollagenen Typ III (Birk und Mayne, 1997; Niederreither et al., 1995), Typ V (Birk und Mayne, 1995; Imamura et al., 2000), Typ VI (Ros et al., 1995; Watanabe et al., 1997), Typ XII (Wälchli et al., 1994; Zhang et al., 2003; Oh et al., 1993) und Typ XIV (Wälchli et al., 1994; Young et al., 2000) zusammen. Kollagen Typ III und Typ V bilden zum Beispiel mit Kollagen Typ I heterotypische Fibrillen (Canty und Kadler, 2002). Ebenso gehören nicht fibrilläre Kollagene oder interfibrilläre Matrixkomponenten, zu denen die Proteoglykane und die Glykosaminglykane zählen, zu den Matrixkomponenten und kommen sowohl in Sehnen- als auch in den meisten anderen extrazellulären Matrices vor. Sie stellen also keine spezifischen Marker für die Tendogenese dar.

#### **1.2.1.2 Wachstumsfaktoren und Antagonisten**

Zu den in den Sehnen identifizierten Wachstumsfaktoren und Antagonisten gehören BMP4 (D'Souza und Patel, 1999), FGF8 und FGF18 (Edom-Vorvard et al., 2001a; Ohuchi et al., 2000), Follistatin (D'Souza und Patel, 1999), TGF $\beta$ -2 (Merino et al., 1996) und GDF 5, 6 und 7 (Wolfman et al., 1997).

In den distalen Sehnen der Extremitäten werden zum Beispiel TGF- $\beta$ 2 und FGF18 exprimiert. Die genetische Verbindung der Wachstumsfaktoren zu den Matrixkomponenten ist aber nur ansatzweise geklärt. TGF- $\beta$ 2 ist in der Lage, die Expression von Matrixkomponenten zu modifizieren. Dabei verändert sich der mRNA-Gehalt von Kollagen Typ XII und Typ XIV in der Matrix der Tenozyten (Arai et al., 2002).

Bei GDF (growth and differentiation factor) 5, 6 und 7 handelt es sich um Wachstumsfaktoren, die mit den BMPs (bone morphogenetic proteins) verwandt sind. Es wurde gezeigt, dass bei subkutaner oder intramuskulärer Implantation dieser Faktoren die Expression von vielen putativen Sehnenmarkern (Kollagen Typ I, Elastin und Decorin) induziert wird (Wolfman et al., 1997).

#### **1.2.1.3 Transmembranproteine**

Als Transmembranproteine werden solche Proteine bezeichnet, die beide Seiten der Phospholipiddoppelschicht einer Membran durchqueren. Zu ihnen gehören unter anderem Ionenkanäle, Membranrezeptoren, Transporter, ATP-abhängige Pumpen und Zelladhäsionsmoleküle.

Zu denen in den Sehnen exprimierten Transmembranproteinen gehören *EphA-4* (Patel et al., 1996) und Tenomodulin (Brandau et al., 2001).

*EphA-4* gehört zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die in den distalen Sehnen der Extremitäten exprimiert wird. Dabei benötigt die *EphA-4* vermittelte Signalmediation einen direkten Zell-Zell-Kontakt (Patel et al., 1996; D'Souza und Patel, 1999).

*Tenomodulin* gehört zu den Typ II Transmembran-Glykoproteinen und wird vorwiegend in Sehnen, aber auch in Ligamenten und im Auge exprimiert.

#### **1.2.1.4 Transkriptionsfaktoren**

Verschiedene Transkriptionsfaktoren spielen während der Entwicklung von Extremitäten eine Rolle. In den sich bildenden Sehnen werden *Eya1* und *Eya2* (Xu et al., 1997), *Six1* und *Six2* (Oliver et al., 1995), *zfhx1a* (Tylzanowski et al., 2003) und *Scleraxis* (*scx*) (Schweitzer et al., 2001) exprimiert.

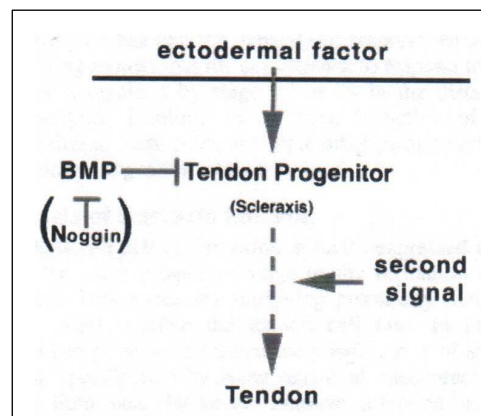
Die Transkripte der beiden homeobox-enthaltenden Gene *Eya1* und *Eya2* sowie *Six1* und *Six2* wurden zunächst in Vorläuferzellen des Bindegewebes und später in verschiedenen Bereichen von Sehnen der Extremitäten gefunden. Sie zeigen ein komplementäres Expressionsmuster: *Six1*/*Eya2* sind auf die dorsalen Sehnen der Extensoren beschränkt, während *Six2*/*Eya1* in



den ventralen Sehnen der Flexoren gefunden werden können. Allerdings handelt es sich auch bei diesen Transkriptionsfaktoren um keine ausschließlich sehnen-spezifischen Marker, da sie auch in anderen Geweben des Körpers vorkommen.

*Scleraxis* wird in die Klasse B der basic Helix-loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren eingegliedert, dessen frühe Expression die Vorläuferzellen von Sehnen und Ligamenten markiert. Es wurde gezeigt, dass diese Vorläuferzellen durch ektodermale Signale induziert und durch das Signalling von BMPs innerhalb des Mesenchyms begrenzt werden (Abbildung 11). Wird die BMP-Signalvermittlung durch *Noggin* gehemmt, werden weitere Vorläuferzellen induziert. Durch überschüssige Vorläuferzellen werden aber keine zusätzlichen Sehnen gebildet. Dieses legt die Vermutung nahe, dass andere weitere Signale die Bildung von voll entwickelten Sehnen regulieren. Die gleichen Signale scheinen auch für die Bildung von distalen Sehnen verantwortlich zu sein, bei denen endogenes *Noggin*, das von verdicktem Knorpel exprimiert wird, Sehnen induziert (Schweitzer et al., 2001).

Da *Scleraxis* sowohl in den Sehnenvorläuferzellen des Syndetoms (Abbildung 10) als auch in den differenzierten Sehnen und Ligamenten exprimiert wird, wird dieser Transkriptionsfaktor als einer der aussichtsreichsten Marker für die Sehnenentwicklung angesehen (Schweitzer et al., 2001).



**Abbildung 11:** Regulation des Schicksals von Sehnenzellen. Die Vorläuferzellen von Sehnen werden durch ektodermale Signale induziert. Durch BMP-Signaling werden die Vorläuferzellen innerhalb des Mesenchyms begrenzt. Noggin wirkt gegen BMP und hemmt dieses. Zur Bildung von voll entwickelten Sehnen ist ein zweites Signal notwendig (Schweitzer et al., 2001).

Um den Mechanismus, mit dem *Scleraxis* die Sehnenbildung induziert, zu entschlüsseln, haben Murchison et al. 2007 konditionale *Scleraxis*-Null-Mutanten generiert. In diesen Mutanten wurden Sehnenvorläufer-Zellen entsprechend dem Wildtyp angelegt. Allerdings waren diese Vorläufer-Zellen nicht mehr in der Lage, sich zu reifen Sehnen zu ordnen, sondern verblieben als loses organisiertes Mesenchym. Außerdem zeigten die Sehnenzellen der Mutanten Defekte in der Sekretion struktureller Matrixkomponenten und in der Matrixorganisation. Das lässt darauf schließen, dass *Scleraxis* für die Umwandlung von Sehnenvorläufern in reife Sehnen verantwortlich ist, nicht aber für die Determinierung der Zellen zur Sehnenzellbildung.

### 1.3 Heilungsprozess von gerissenen Sehnen

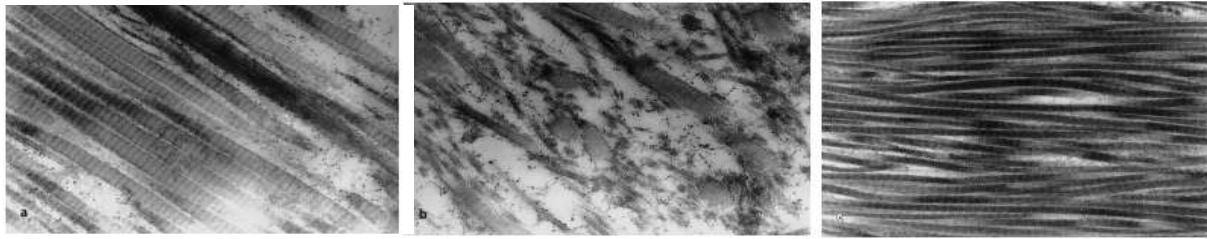
Band- und Sehnenverletzungen gehören zu den häufigsten Verletzungen in der Unfallchirurgie und Orthopädie. Ein Großteil dieser Verletzungen ereignet sich im Freizeit- und Leistungssport. Trotz eines enormen Therapiewandels in den letzten 15 Jahren - von immobilisierend nach funktionell - ist das Ziel einer Restitutio ad integrum nach Verletzungen noch nicht erreicht. Band- und Sehnenheilung bedeutet immer noch Reparatur und nicht Regeneration. Ligamentäre Gelenkverletzungen können daher zu einer dauerhaften Störung der Gelenkkinematik mit Funktionsverlust, Degeneration und Schmerzen führen. Das

zunehmende Verständnis für die strukturelle Komplexität von Band- und Sehnengewebe sowie für die komplexen Mechanismen bei der Heilung wird in Zukunft die Therapie von Band- und Sehnenverletzungen beeinflussen. Das Tissue Engineering -ein Verfahren, Ersatzorgane und -gewebe neu zu züchten- bietet prinzipiell die Möglichkeit, die originäre Struktur von Sehnen und Bändern herzustellen, um so wieder eine physiologische Gelenkkinematik zu ermöglichen und vorzeitige degenerative Veränderungen zu vermeiden.

Im Allgemeinen vollzieht sich die Heilung einer Sehnenverletzung in vier sich überlappenden Phasen: (1) Vaskuläre Phase, (2) Entzündungsphase, (3) Reparative Phase, (4) Remodelling Phase.

Als vaskuläre Phase wird der Zeitpunkt direkt nach dem Trauma bezeichnet. Sie beinhaltet die Blutung der Wunde, die Blutstillung durch das Zusammenziehen der Gefäße, die Aktivierung der Blutgerinnung durch Thrombozyten sowie die Kaskade der Blutgerinnung. Nach 6 bis 48 Stunden setzt die Entzündungsphase ein. Sie wird geprägt durch Migration von Entzündungszellen und Fibroblasten. Die neutrophilen Granulozyten sind für den Abbau von zerstörtem Gewebe und für die Phagozytose von Infektionserregern verantwortlich. Die eingewanderten Makrophagen übernehmen ebenfalls diese Aufgaben, initiieren aber auch die Bildung von kleinen Gefäßen (Angiogenese). Des Weiteren sind sie am Abbau von Fibrin und an der Aktivierung von Zellteilung beteiligt. Zu den weiteren Zellen, die im Entzündungsherd vorzufinden sind, gehören die Lymphozyten und die Thrombozyten. Ihre Hauptaufgaben bestehen in der weiteren Zellaktivierung und in der Freisetzung von Zytokinen. Drei Tage nach dem Trauma setzt die reparative Phase ein. Die immigrierten Fibroblasten beginnen mit der Kollagensynthese. Zunächst weist die Verlaufsrichtung dieser neu gebildeten Kollagenfasern keine einheitliche Orientierung auf, dennoch tragen sie wesentlich zur biomechanischen Festigkeit der zu überbrückenden Defektzone bei. Der Kollagenanteil vom Typ III nimmt bis in die 5. Woche hinein kontinuierlich zu. In dieser Zeit bilden Endothelzellen Kapillare und kleine Blutgefäße. Die reparative Phase erstreckt sich über zwei Monate nach Sehnenverletzung. Die endgültige biomechanische Stabilität erhält die geheilte Sehne im Rahmen des Remodelling oder der Reifungsphase. Es kommt zur Reorientierung von Kollagenfibrillen im Belastungsverlauf. Die Zugfestigkeit wird durch Querverbindungen zwischen den einzelnen Kollagenfibrillen gesteigert. Des Weiteren kommt es zu einer Verschiebung des in der reparativen Phase gebildeten Kollagen Typ III zu dem mechanisch widerstandsfähigeren Kollagen Typ I.

Trotz der extremen Remodellingphase erfolgt keine vollständige Regeneration der Sehnenläsion. Die neugebildeten Kollagenfibrillen besitzen einen geringeren Durchmesser als zuvor (Abbildung 12). Dadurch ist die biomechanische Belastbarkeit niedriger. Eine Sehnenverletzung führt somit zu signifikanten Dysfunktionen.



**Abbildung 12:** Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung des Kollagenfibrillenverlaufs der Extensorsehne. (a) Normale Sehne, parallele Anordnung vorwiegend dicker Kollagenfibrillen Typ I. (b) Defekte Sehne, ungeordnet Fibrillenarchitektur. Dünne, neusynthetisierte Fibrillen verlaufen zwischen alten fragmentierten Kollagenfibrillen. (c) Defekte Sehne nach 26 Wochen: Kollagenfibrillen verlaufen wieder parallel. Die neugebildeten Fibrillen weisen jedoch einen reduzierten Fibrillendurchmesser auf. (Möller et al., 2000)

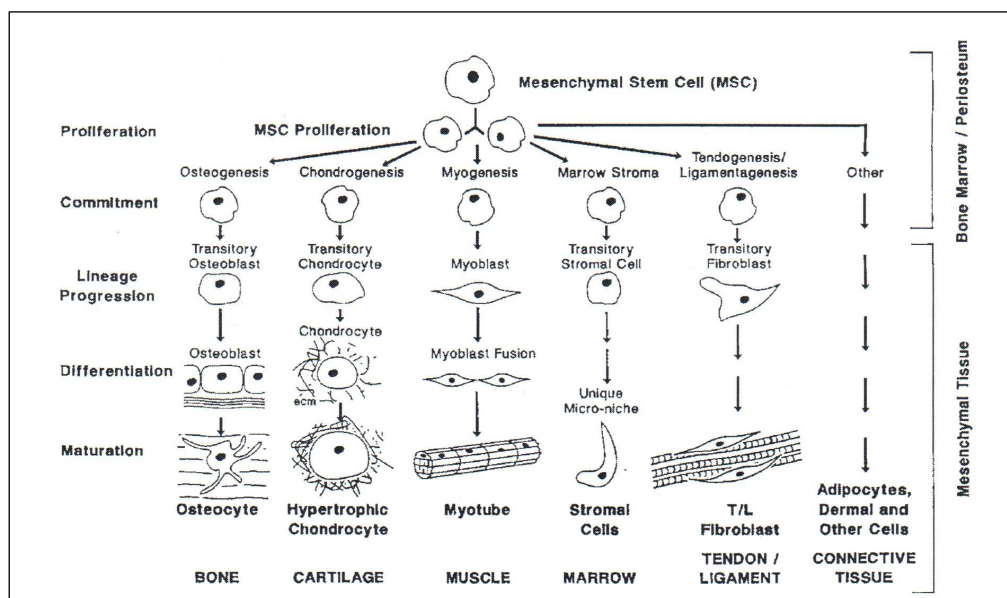
## 1.4 Stammzellen

Der erwachsene Organismus besitzt etwa 300 verschieden spezialisierte Zelltypen. Wenn einige dieser Zellen sterben oder bei kleineren Schäden (zum Beispiel Verletzungen), verfügen die meisten Gewebe über die Fähigkeit der Selbstregeneration.

Stammzellen sind Körperzellen, die noch nicht ausdifferenziert sind. Sie sind in der Lage, ständig neue, organspezifische Tochterzellen zu erzeugen, wobei sie selbst nicht absterben. Durch eine asymmetrische Zellteilung sind sie in der Lage, einerseits Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften zu generieren und andererseits andere Tochterzellen mit Ausdifferenzierung hervorzubringen. Ausschlaggebend für das Zellschicksal ist das biologische Milieu, in dem sich die Zelle befindet.

Je nach ihrem ontogenetischem Alter und ihrem Differenzierungspotential werden Stammzellen in vier Gruppen unterteilt:

(1) embryonale, (2) adulte, (3) hämatopoetische und (4) mesenchymale Stammzellen.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Differenzierungsrichtungen von mesenchymalen Stammzellen. (Caplan, 2005)

Embryonale Stammzellen sind die ontogenetisch frühesten Zellen. Sie wurden erstmals 1981 aus der Blastozyste isoliert (Austin et al., 1981; Evans und Kaufmann, 1981). Es handelt sich hierbei um pluripotente Zellen, die sich in die primitiven Keimbahnzellen und auch in die somatischen Stamm- und Vorläuferzellen entwickeln können. Adulte Stammzellen (auch gewebespezifische Stammzellen genannt) sind in ihrer Differenzierungsrichtung

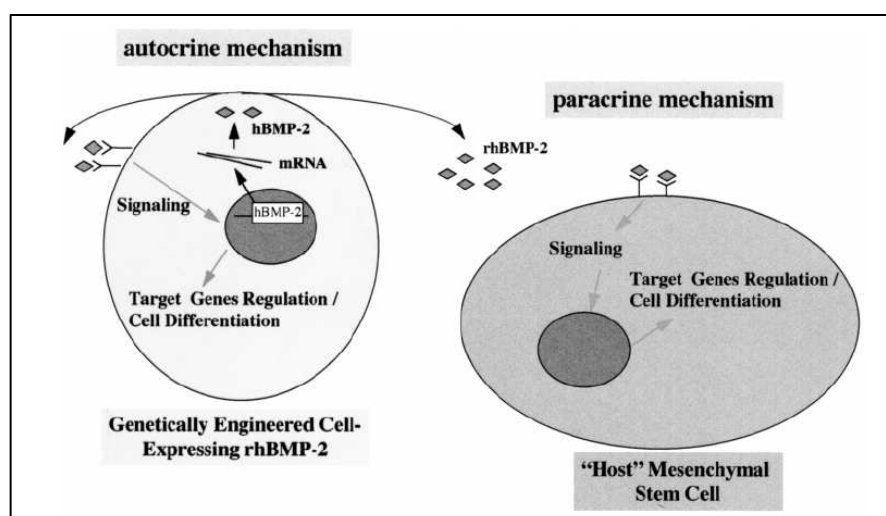
eingeschränkt. Sie werden unter anderem aus dem Knochenmark isoliert. Als hämatopoetische Stammzellen werden Zellen bezeichnet, aus denen sich durch Zellteilung und zunehmende Differenzierung die Blutzellen, zum Beispiel Erythrozyten, entwickeln. Ebenfalls aus dem Knochenmark werden mesenchymale Stammzellen isoliert. Sie können in Fett-, Knorpel-, Muskel- oder Sehnenzellen differenzieren und sind eingeschränkt pluripotent (Abbildung 13; Caplan, 2005). Adulte mesenchymale Stammzellen haben *in vivo* die Aufgabe, Ersatz für vor allem von mesenchymalen Gewebe und abgestorbene oder aufgrund von Verletzungen und Krankheiten verendete Zellen zu liefern. Dieser Prozess des stammzellvermittelten Ersatzes von Zellen verringert sich beim Menschen im Alter ab Ende Zwanzig (Caplan, 2005).

Die höchste Stammzellendichte gibt es im Knochenmark, wohingegen Sehnen und Knorpel einen extrem geringen Anteil von Stammzellen aufweisen. Gerade hier passieren aber häufig Verletzungen. Weil sich in Sehnen und Knorpel nur wenige Stammzellen befinden, erfolgt der Heilungsprozess (zum Beispiel die Neubildung von Gewebe) nur sehr langsam. Verabreicht man hier körpereigene Stammzellen, so könnte der natürliche Heilungsprozess entscheidend beschleunigt werden. Die Rückfallhäufigkeit einer Sehnen- oder/ und Gelenkserkrankung könnte möglicherweise ebenfalls signifikant reduziert werden.

Somit ist heutzutage in der regenerativen Medizin der Einsatz von Stammzellen zum Beispiel für eine Therapie bei Krankheiten des Bewegungsapparates nicht mehr wegzudenken.

### 1.5 BMP2-exprimierende mesenchymale Stammzellen bilden nach ihrer Implantation *in vivo* durch zwei Mechanismen Knochen: autokrin und parakrin

Mesenchymale Stammzellen können bei Anwesenheit des Wachstumsfaktors BMP2 in die osteogene Richtung differenzieren (siehe 1.6.1). Rekombinantes humanes BMP2 (rhBMP2) ist ein Protein mit einem sehr hohen osteogenen Potential, dass *in vivo* die Knochenbildung und *in vitro* die Osteogenese induziert. Die Expression von rhBMP2 in C3H10T1/2-Zellen kann die Differenzierung in Osteoblasten und Chondrozyten induzieren. Dan Gazit et al. haben ein stammzellabhängiges Modellsystem zur Heilung von Knochenbrüchen etabliert. Durch Implantation von modifizierten rhBMP2-exprimierenden C3H10T1/2-Zellen konnten sie zeigen, dass die mesenchymalen Stammzellen einen erhöhten therapeutischen Effekt in heilenden Knochendefekten besaßen, was auf das rekombinant exprimierende rhBMP2 zurückzuführen war: Das übte einen parakrinen Effekt auf die transplantierten Stammzellen und einem autokrinen Effekt auf die Stammzellen des Wirtes aus (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Parakriner und autokriner Mechanismen über die Kontrolle der Knochenregenerierung. (Gazit et al., 2001)

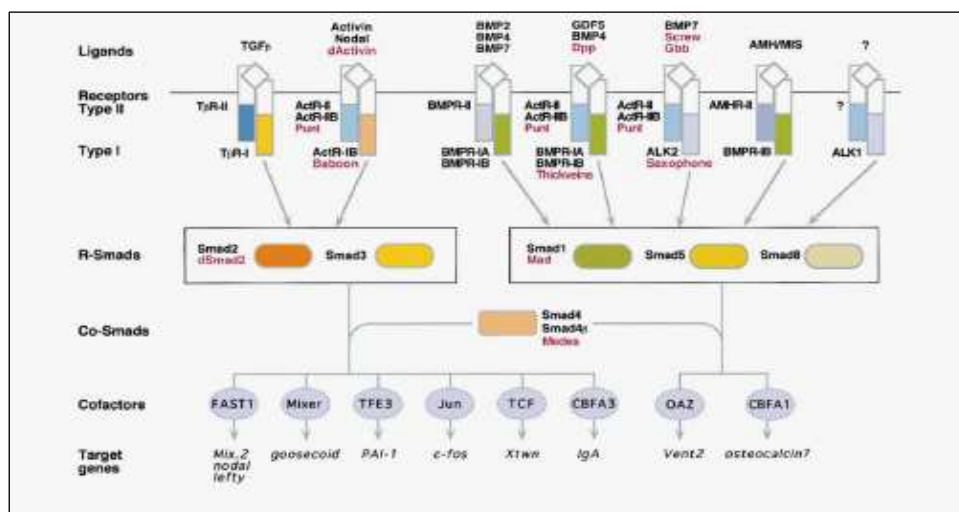
Von einem autokrinen Mechanismus wird gesprochen, wenn die Wirkung für die eigene Zelle bestimmt ist. Ist die Wirkung für benachbarte Zellen bestimmt, bezeichnet man sie als parakrin.

## 1.6 Die TGF- $\beta$ Superfamilie

Die TGF- $\beta$  Superfamilie zeichnet sich durch ein gemeinsames Strukturmotiv, dem Zysteinknoten aus, der zur Bildung von drei konservierten Paaren von intrazellulären Disulfidbrücken führt. Die Superfamilie wird anhand der Signalweiterleitung durch die rezeptor-assoziierten Smads und aufgrund der Sequenzhomologien in fünf Untergruppen unterteilt (Abbildung 15). Die fünf Untergruppen enthalten jeweils mehrere Proteine:

- **TGF- $\beta$ -Unterfamilie:** TGF- $\beta$ -1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3 und - $\beta$ 4 (Burt und Paton, 1992). Ihre Funktion liegt sowohl in der Inhibierung als auch in der Stimulierung der Proliferation und Differenzierung bestimmter Zelllinien (Kingsley, 1994).
- **Activin-Unterfamilie:** Inhibin- $\beta$ A und - $\beta$ B. Sie bilden Homo- und Heterodimere aus den jeweiligen Untereinheiten und können mit Inhibin- $\alpha$  dimerisieren.
- **dpp (drosophila decapentaplegic)-Unterfamilie:** dpp (Padgett et al., 1987), BMP2 und BMP4 (Wozney et al., 1988; Wozney, 1998), Drosophila-Gen 60A (Wharton et al., 1991; Doctor et al., 1992), BMP5, BMP6, auch Vgr-1 genannt, BMP7, auch OP-1 (osteogenic protein 1) genannt, BMP8a, auch OP-2 genannt, und BMP8b (Celeste et al., 1990; Lyons et al., 1989; Ozkaynak et al., 1990/1992).
- **60A-Unterfamilie:** Drosophila-Gen 60A, dazu homolog in Säugern BMP5 bis BMP8. Sie besitzen osteoinduktive Eigenschaften.
- **GDF-Unterfamilie:** Faktoren GDF-5, BMP12 und BMP13

Der Aufbau der Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie ist bei allen Mitgliedern sehr ähnlich. Sie werden als Präproproteine synthetisiert, die ungefähr drei Mal so lang sind wie die mature Domäne (Jones et al., 1994). Jedes Protein besitzt eine N-terminale Signalsequenz, mit deren Hilfe es an die Zelloberfläche gelangt. Dort verbleibt es in der Extrazellulärmatrrix. Des Weiteren besitzt es eine Prodomäne und eine mature Domäne am Carboxy-terminalen Ende. Solange die Prodomäne an das Protein gebunden ist, sind diese noch inaktiv. Erst durch die proteolytische Abspaltung der Prodomäne werden die Proteine aktiv (Hogan, 1996).



**Abbildung 15:** Signaltransduktion der TGF- $\beta$  Superfamilie. (Massagué, Blain et al., 2000)

### 1.6.1 BMP (Bone Morphogenetic Protein = Knochenmorphogeneseprotein)

Die Knochenmorphogeneseproteine sind Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie. Im Jahr 1965 entdeckte Marshall Urist das osteoinduktive Potential von demineralisierter Knochenmatrix, führte dieses auf bestimmte Moleküle zurück und gab ihnen den Namen Bone Morphogenetic Proteins, kurz BMPs (Urist et al., 1965).

Bisher wurden mehr als 20 Mitglieder der BMP-Familie in Organismen vom Seeigel bis hin zu den Säugetieren gefunden (Hogan, 1996). Anhand der Proteinsequenz an ihrem N-terminalen Ende lassen sich die sonst so ähnlichen Proteine in weitere Untergruppen unterteilen.

BMP2 ist ein 32kDa großes homodimeres Protein. Es wird als ein 453 Aminosäuren langes Proprotein synthetisiert und nach Glykosylierung, proteolytischer Spaltung und Dimerisierung entsteht das reife Protein aus den 114 C-terminalen Aminosäureresten (Lyons et al., 1991; Scheufler et al., 1999). BMP2 besitzt, wie alle Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie, das charakteristische Zysteinmotiv, wobei sechs Zysteinreste eine Bildung zwischen den beiden Polypeptidketten des Dimers herstellt. Die Sequenz am N-terminalen Ende, die dem ersten Zysteinrest vorangeht, besteht aus vielen positiv geladenen Aminosäuren und ist unter anderem für die Heparinbindung verantwortlich (Koenig et al., 1994; Ruppert et al., 1996).

Durch die Dimerisierung entsteht ein hydrophober Kern, der das Protein stabilisiert. Ebenfalls gibt es an der Oberfläche von BMP2 große hydrophobe Bereiche. Dies scheint seine ungewöhnlich schlechte Löslichkeit zu erklären, denn BMP2 neigt oft zu Aggregation (Ruppert et al., 1996; Scheufler et al., 1999).

Während BMP2 in den meisten Fällen als Homodimer biologisch aktiv ist, werden in der Literatur zunehmend Heterodimere beschrieben, die funktionell den Homodimeren in ihrer biologischen Aktivität überlegen sein sollen (Hogan, 1996; Miyazono et al., 2001).

### 1.6.2 Die BMP-Rezeptoren

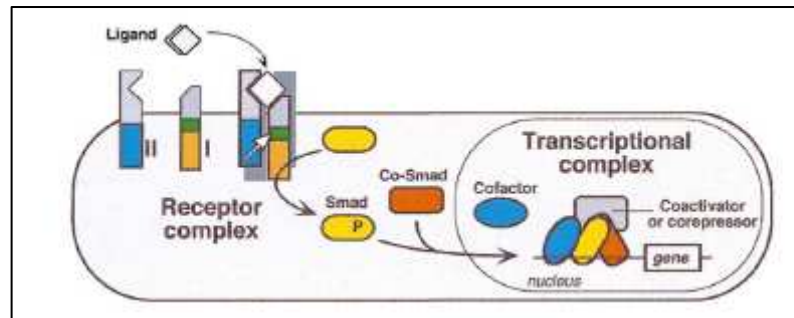
Die Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie binden nach ihrer Aktivierung an spezifische Rezeptoren (Abbildung 16). Die TGF- $\beta$ -Rezeptorfamilie ist eine Gruppe von Transmembranproteinen mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität und wird anhand von Struktur und Funktion der Kinase in Typ-I und Typ-II Rezeptoren unterteilt (Massagué, 1998). Die Typ-I Unterfamilie wird durch eine als GS-Domäne benannte Region charakterisiert (Wrana, Attisano et al., 1994). Jeder der bisher sieben bekannten Typ-I Rezeptoren kann mit einem der fünf bekannten Typ-II Rezeptoren interagieren. Die Signalspezifität wird aber nur vom Typ I Rezeptor vermittelt (Attisano und Wrana, 2002).

Zu den Typ-II Rezeptoren gehören der Activin R Typ-II und Activin R Typ-II B (ActR-II und ActR-II B), der TGF- $\beta$ -Typ-II-Rezeptor (T $\beta$ R-II), der MIS Typ-II Rezeptor (MISR-II) und der BMP Typ-II Rezeptor (BMPR-II). Die Typ-I Rezeptoren werden als Activin receptor-like kinases (alk) bezeichnet. Unter den Typ-I Rezeptoren alk1 bis alk7 wurden bisher drei Rezeptoren als BMP-bindend beschrieben, und zwar alk2 und alk3 (auch BMPR-IA genannt) und alk6 (auch BMPR-IB) (Koenig et al., 1994; ten Dijke, 1994).

Zur Aktivierung der Signaltransduktion binden die BMP-Homodimere parallel sowohl an den Typ-II als auch an den Typ-I Rezeptor. Dies stellt eine Besonderheit der BMP-Signaltransduktion dar. Bei den TGF- $\beta$ s findet diese Bindung zeitversetzt statt (Liu et al., 1995). Nach der BMP-induzierten Bildung eines heteromeren Komplexes aktiviert der Typ-II Rezeptor den Typ-I Rezeptor durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten (Massagué, 1998). Diese von Liganden induzierte Phosphorylierung ist notwendig für die anschließende durch den Typ-I Rezeptor erreichte Phosphorylierung der Smad Proteine, die dann das Signal in den Zellkern weiterleiten und dort die Transkription bestimmter Gene aktivieren (Wrana, Attisano et al., 1994; Wieser, Wrana et al., 1995; Souchelnytskyi, ten Dijke et al., 1996). Die aktivierten Smad Proteine binden an Smad 4 (common mediator Smad4) und translozieren gemeinsam in den Zellkern (Abbildung 16). Nach der Bindung von



transkriptionellen Ko-Faktoren und Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren wird die Expression entweder positiv oder negativ beeinflusst (Massagué, 1998; Itoh et al., 2000; Miyazono, Kusanagi et al., 2001; ten Dijke, Goumans et al., 2002).



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung des TGF-β /Smad Signalweges. (Massagué und Chen, 2000)

### 1.6.3 Die Smad-Proteine und ihre Funktionen

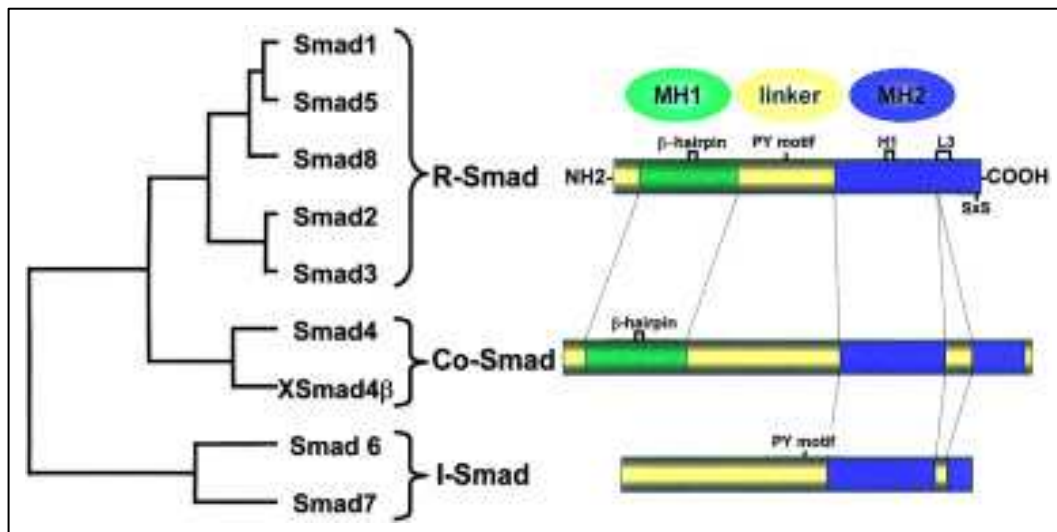
Als Smad-Proteine werden die Proteine zusammengefasst, die intrazellulär an der Signalwegvermittlung von TGF-β-Superfamilienmitgliedern beteiligt sind (Heldin et al., 1997). Funktionell lassen sich die Smad-Proteine in drei Gruppen unterteilen (Abbildung 17):

1. Rezeptor-spezifische Smads, „R-Smads“: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 und Smad8
2. Common mediator Smads, „Co-Smads“: Smad4
3. Inhibitorische Smads, „I-Smads“: Smad6 und Smad7

Die Mitglieder der Smad-Familie bestehen aus hochkonservierten Proteinen. Die ersten Vertreter dieser Proteinfamilie wurden in *Drosophila melanogaster* (Mothers against decapentaplegic, Mad) und *Caenorhabditis elegans* (small genes 2, 3, 4, Sma) beschrieben (Sekelsky, Newfeld et al., 1995; Savage, Das et al., 1996). Der Name der Smad Proteine leitet sich wegen ihrer Homologie zu den eben genannten Proteinen aus „Sma“ und „Mad“ ab, die zu „Smad“ verbunden wurden (Liu, Hata et al., 1996). Neben dem ersten humanen Vertreter Smad1 (Liu, Hata et al., 1996) wurden bisher 7 weitere Mitglieder beschrieben (Smad2 bis Smad8). Smad-Proteine sind intrazelluläre Proteine, die das Signal von Wachstumsfaktoren der TGF-β Superfamilie weiterleiten. Die mittlerweile über 50 bekannten Mitglieder regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose. Sie spielen aber auch in der Embryogenese und bei der Gewebehomöostase eine Rolle (Massagué, 1998; Kriegstein, Strelau et al., 2002).

Smad-Proteine sind zwischen 42kDa und 60kDa groß und sind in ihrer Aminosäuresequenz auch zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert. Die I-Smads enthalten eine konservierte C-terminale Mad Homologie 2 Domäne (MH2). Die R- und Co-Smad Proteine haben N-terminal eine zusätzliche MH1-Domäne (Shi, Hata et al., 1997; Shi, Wang et al., 1989). Die MH1 Domäne hemmt bei den R-Smads intramolekular die Aktivität der MH2 Domäne (Hata, Lo et al., 1997). Am Ende der MH2-Domäne befindet sich ein SSXS-Motiv, das durch den aktivierten Typ-I Rezeptor an zwei Serinresten phosphoryliert wird (ten Dijke et al., 2000; Macias-Silva et al., 1996; Kretschmar et al., 1997). Die MH2-Domäne besitzt somit transaktivierende Eigenschaften, wobei im normalen inaktivierten Zustand die Smads im Zytoplasma lokalisiert sind (Baker und Harland, 1996). Zwischen der MH1 und MH2 Domäne befindet sich in allen Smad-Proteinen eine prolinreiche Linker-Region. Sie enthält bei den R-Smads mehrere PXSP-Motive. Die Spezifität der Smad-Moleküle untereinander, zu Aktivatoren und zu assoziierten Proteinen wird von der Linker-Domäne vermittelt. Die MH1-Domäne ist in der Lage, die transkriptionelle und biologische Aktivität der MH2-Domäne zu unterdrücken (Hata et al., 1997). Daraus könnte geschlossen werden, dass die MH1-Domäne

inhibitorisch auf die MH2-Domäne wirkt und es sich bei der MH2-Domäne um den biologisch aktiven Teil im Smad-Protein handelt. Durch die Phosphorylierung des SSXS-Motives und einer darauf folgenden Konformationsänderung des Proteins wird die Inhibition der MH2-Domäne durch die MH1-Domäne aufgehoben.



**Abbildung 17:** Phylogenetischer Stammbaum und schematischer Aufbau der Smad Proteine. (Itoh et al., 2000)

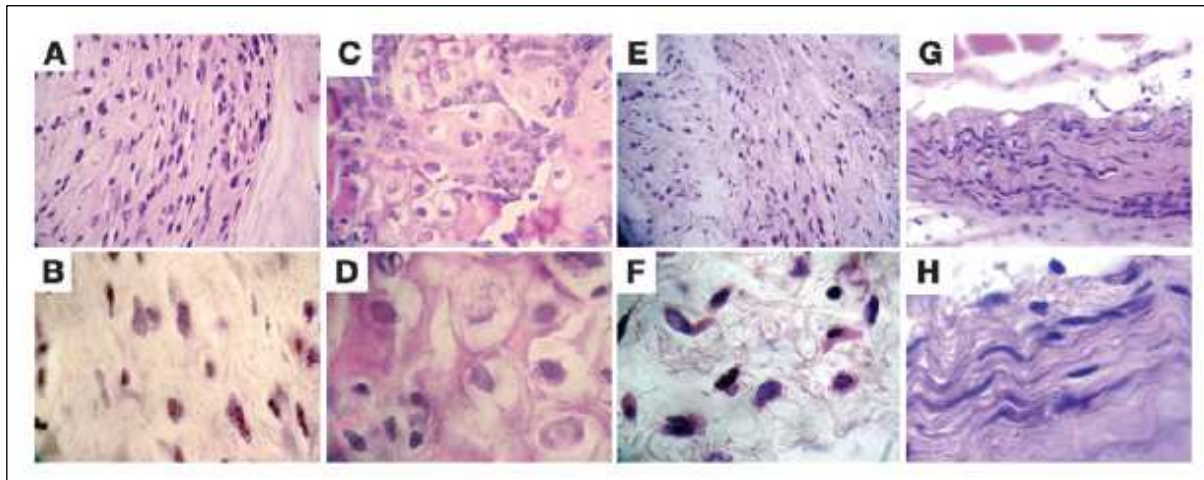
### 1.7 Auswirkungen von Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung von C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen

In vorangegangenen Studien wurden die Auswirkungen einer biologisch aktiven Variante von Smad8 (Smad8 L+MH2) in Hinsicht auf die Differenzierung von mesenchymalen Progenitorzellen untersucht, die zusätzlich rekombinant BMP2 exprimierten (C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>/Smad8 L+MH2).

Im Fall von Smad8 L+MH2 wurde die MH1-Domäne entfernt, so dass diese die Funktionalität der MH2-Domäne durch eine räumliche Interaktion nicht mehr behindern kann. Dadurch ist dieses Protein konstitutiv aktiv. Diese Daten wurden zum Teil mit in dieser Doktorarbeit erzielt. Es wurde untersucht, welche Auswirkung Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung der fibroblastoiden mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> hat. Bekannt war, dass die C3H10T1/2-Zellen in vier mesenchymale Entwicklungsrichtungen differenzieren können: Osteogenese, Chondrogenese, Adipogenese und Myogenese (Doherty und Canfield, 1999; Taylor und Jones, 1979). Durch *in vitro* und *in vivo* Versuche konnte gezeigt werden, dass diese Zellen auch die Richtung der Sehnen- und Ligamententwicklung differenzieren (Hoffmann et al., 2006).

*In vivo* Untersuchungen zeigten, dass BMP2- und Smad8 L+MH2- exprimierende C3H10T1/2-Zellen bei ektopischer subkutaner Implantation in C3H/HeN Mäusen zu Tenozyten-ähnlichen Zellen differenzierten (Hoffmann et al., 2006). Die Bildung von Sehnengewebe wurde durch histologische Untersuchungen bestätigt (Abbildung 18).





**Abbildung 18:** Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von ektopisch implantierten mesenchymalen Zellen. A und B: C3H10T1/2-Zellen, es ist keine spezifische Differenzierung zu beobachten; C und D: C3H10T1/2<sup>BMP2</sup>-Zellen, die Zellen entwickeln sich zu Knorpel- und Knochengewebe; E und F: C3H10T1/2<sup>Smad8 L+MH2-</sup>-Zellen, es ist keine spezifische Differenzierung der Zellen zu beobachten; G und H: C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2-</sup>-Zellen, die Zellen entwickeln sich zu Tenozyten. Die Implantation erfolgte subkutan für 30 Tage. Vergrößerung 40fach (A, C, E und G) beziehungsweise 100fach (B, D, F und H). (Hoffmann et al., 2006)

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Implantationen mit diesen Zellen zu einer Behebung eines Teildefekts in der Achillessehne führten (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Ektopische Implantation von C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2-</sup> Zellen in die Achillessehne einer C3H/HeN Maus (Tag 30). (Hoffmann et al., 2006)

Solche *in vitro* und *in vivo* Analysen der Zelldifferenzierung ermöglichen die Untersuchung des Einflusses diverser Faktoren auf die Differenzierung von Zellen und erlauben die Aufklärung von Signalwegen und deren Regulation im Zusammenhang der Differenzierungsvorgänge. Mit Hilfe der Untersuchung von spezifischen Markergenen in unterschiedlichen Stadien der Zelldifferenzierung ist eine Analyse des Differenzierungsablaufes möglich.

### 1.8 Einsatz von viralen Vektoren in der Gentherapie – Adenoviren versus Lentiviren

Das Erbgut einer Zelle kann durch spezifischen Gentransfer mittels molekularbiologischer und gentechnologischer Methoden verändert werden. Die gentechnisch veränderte Zelle synthetisiert Proteine, die normalerweise nicht oder nur in geringen Mengen von dieser Zelle produziert werden. Für eine Gentherapie ergeben sich dadurch zahlreiche Vorteile im Vergleich zur klassischen Medikamententherapie. Ein wichtiger Punkt ist der Wegfall von systemischen Nebenwirkungen der Medikamente, da der Wirkstoff von der eigenen Zelle synthetisiert und lokal manipuliert werden kann. Des Weiteren können transfizierte Zellen das gewünschte Protein in gleich bleibenden Konzentrationen über einen bestimmten Zeitraum eigenständig synthetisieren. Bei einer Arzneimitteltherapie werden dagegen pharmakologisch wirksame Konzentrationen nur nach wiederholter Applikation erreicht.

Virale Vektoren sind für den Transport von Genen sehr effektiv, da das Einschleusen von genetischem Material in die Wirtszelle zum natürlichen Lebenszyklus von Viren gehört. In der Gentherapie werden entweder Adenoviren oder Retroviren, zu denen unter anderem die Lentiviren gehören, verwendet. Die DNA der Adenoviren wird extrachromosomal im Zellkern lokalisiert und nicht in das Genom der Wirtszelle integriert (Kay et al., 2001). Dadurch geht im Verlauf einiger Zellteilungen die Virus-DNA verloren. Bei Verwendung von adenoviralen Vektoren in der Gentherapie ist der therapeutische Effekt somit zeitlich begrenzt. Die DNA der Lentiviren wird hingegen willkürlich in das Genom der Wirtszelle eingebaut und wird daher bei jeder Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben (Kay et al., 2001). Daher könnten Retroviren in der Gentherapie besonders bei chronischen Krankheiten zum Einsatz kommen (Oberholzer et al., 2006).

Ein Nachteil bei der Verwendung von Retroviren in der Gentherapie ist jedoch, dass diese eine Insertionsmutagenese hervorrufen können. Dabei kommt es zu einer Veränderung eines essentiellen Genprodukts durch die stabile Integration viraler DNA in das Wirtsgenom, welches die Bildung eines Malignom induzieren kann (Crystal, 1995). In einer Studie zur Behandlung einer angeborenen schweren Immunschwäche (X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID) wurde beschrieben, dass es durch den retroviralen Gentransfer von IL-2-Rezeptoren in Knochenmarkszellen zur Entstehung von Leukämie kam (Marshall, 2003).

Ein Nachteil von Adenovirus-Vektoren der ersten Generation, die noch eine Reihe viraler Gene enthalten, ist die aufgrund der Expression dieser Gene nachgewiesene Induktion einer zellulären und humoralen Immunreaktion gegen die adenoviralen Proteine und die transduzierte Zelle (Yang et al., 1994; Wilmott et al., 1996). Um die Immunreaktion durch Adenoviren zu reduzieren, wurden bei Adenoviren der zweiten Generation die viralen E2- und E4-DNA-Regionen entfernt. Dadurch kommt es bei diesen rekombinanten Adenoviren zu einer geringeren Expression viraler Proteine und so zu einer verminderten Aktivierung des Immunsystems (Gao et al., 1996).

## 2 Ziele der Doktorarbeit

Über die stammzellabhängige Entwicklung und Differenzierung in Sehnengewebe ist nur wenig bekannt. Da bisher keine spezifischen Markergene für die Bindegewebsentwicklung beschrieben wurden, ist eine Analyse der Sehnenentwicklung *in vitro* schwierig.

Aufgrund der morphologischen Veränderungen der fibroblastoiden mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8</sub> L+MH2 *in vitro*, die während ihrer Differenzierung sehnens-ähnliche Zellen bildete, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit zunächst das Expressionsverhalten verschiedener Markergene während der Differenzierung in dieser Zelllinie analysiert werden. Zum Vergleich sollte die mesenchymale Progenitorzelllinie C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> dienen, die in die osteogene Richtung differenziert. Die erzielten *in vitro* Ergebnisse sollten durch *in vivo* Analysen bestätigt werden. Dazu sollte ein ektopisches Implantationsmodell etabliert werden, in dem die modifizierten Vorläuferzellen auf einer Trägermatrix subkutan und intramuskulär in Mäuse implantiert werden. Durch histologische Untersuchungen dieser *in vivo* Versuche sollte das Verhalten modifizierter mesenchymaler Stammzellen auf die Sehnenbildung untersucht werden.

Im nächsten Schritt sollte ein adeno- und lentivirales Expressionssystem zur Untersuchung der Entwicklungsfähigkeit von modifizierten mesenchymalen Stammzellen in Richtung Tendogenese etabliert werden. Auch hier sollten die murinen, aber auch humane mesenchymale Stammzellen in Mäuse ektopisch implantiert werden, um eine faktorabhängige Sehnenentwicklung zu charakterisieren.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit sollte das Auffinden neuer Faktoren darstellen, die in der Sehnenentwicklung eine Rolle spielen könnten. Hierzu sollte eine Microarray Analyse mit RNAs einer zeitabhängigen Kinetik der sehnensbildenden Zelllinie durchgeführt werden. Es sollten Kandidaten-Gene ausgewählt und einer stammzellabhängigen Funktionsanalyse unterzogen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR – Polymerase Chain Reaction)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wird die 1985 von Kary Mullis entwickelte PCR genutzt (Saiki et al., 1985). Der Reaktionsansatz enthält das Template, zwei spezifische Primer, die vier Desoxynukleotide (dNTPs) zur Synthese des neuen DNA-Stranges, die hitzestabile DNA-Polymerase und einen Puffer, der  $Mg^{2+}$  - Ionen als Ko-Faktor enthält. Das typische PCR-Programm besteht aus drei Schritten: einem Denaturierungsschritt, einem Annealingsschritt und einem Elongationsschritt.

Denaturierung: Durch kurzzeitiges Erhitzen der DNA-Lösung auf 92-94°C werden die beiden Stränge der ursprünglichen DNA getrennt.

Annealing: Nach schnellem Abkühlen der Lösung auf Annealingtemperatur, die sich aus den verwendeten Primern berechnen lässt, können die Primer mit jeweils einem Einzelstrang der DNA hybridisieren. Da die Primer im großen Überschuss zugegeben werden, erfolgt praktisch keine Rückbildung des Doppelstranges aus den beiden Einzelsträngen.

Elongation: Nach Erhitzen der Lösung auf optimale Reaktionstemperatur der Taq-Polymerase (72°C) kommt es durch die Polymerase zur Verlängerung beider Primer in 5'-3'-Richtung. Die Folge ist die Replikation beider Zielstränge.

Diese drei Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt, wobei die jeweils im vorherigen Schritt neu entstandenen DNA-Stränge ebenfalls als Template dienen. Somit kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA ( $2^n$ -fache Vermehrung,  $n$  = Zyklen).

##### 3.1.1.1 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR kann unter anderem die Transkription eines Gens in bestimmten Geweben oder Zellen nachgewiesen oder die Quantifizierung der Expression eines Gens gezeigt werden. Dafür wird aus einer RNA die cDNA synthetisiert (siehe 3.1.12), die anschließend als Template für eine PCR verwendet wird.

##### Standard PCR-Ansatz (20µl):

10,5µl	H <sub>2</sub> O
4µl	5x Puffer
2µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
0,4µl	dNTPs (10mM)
1µl	forward Primer (5µM)
1µl	reverse Primer (5µM)
0,1µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
1µl	Template-DNA

##### Standard PCR-Programm:

1:30 min.	94°C	} 25-35 Zyklen
0:20 min.	94°C	
0:20 min.	x °C	
0:30 min.	72°C	
15:00 min.	72°C	
∞	15°C	

x = Annealingtemperatur der entsprechenden Primer

##### 3.1.2 Real Time PCR

Bei der Real-time PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können. Dieser Reporter kann von nicht-spezifischer Natur sein oder spezifisch mit der Ziel-DNA interagieren. In beiden Fällen steigt die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge an. Real Time Detektionssysteme bestehen im Prinzip aus einem PCR-Cycler sowie einem optischen Detektionsmodul, über das die mit der Produktzunahme

ansteigenden Fluoreszenzwerte online nach jedem Zyklus gemessen werden. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgt mittels der geeigneten Computersoftware. Die Fluorophore werden – je nach System – mit Halogen-, LED- oder Laserlicht angeregt

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder CT-Wert. Der CT-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den CT-Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte, gibt. Parallel dazu werden in jedem PCR-Lauf bekannte Templatemengen amplifiziert, so dass man vergleichen kann, welche Templatemenge man bei welchem CT-Wert erhält. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten CT-Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann.

Bei der Durchführung der Real-Time PCR wurde SYBR®-Green verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA ein. Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Der Vorteil von SYBR®-Green ist die universelle Verwendbarkeit, da es unspezifisch eingebaut wird und in jede beliebige PCR-Reaktion eingesetzt werden kann, sowie die hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle bindet. Es fehlt jedoch eine spezifische Bindung des Fluorophors an die zu amplifizierende Ziel-DNA, so dass eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren, die während der PCR-Reaktion auch einen Fluoreszenzanstieg verursachen können, nicht möglich ist. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren beziehungsweise auch Mutationsanalysen sind im Anschluss an den PCR-Run mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Dabei kommt es durch einen schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren oder Mutationen unterscheiden, da Primerdimere/Mutationen bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte.

	<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/Reaktion</b>	<b>Endkonzentration</b>
	2x QuantiTect SYBR Green		
	PCR Master Mix	10 µl	1x
+	RNase-freies Wasser	6 µl	-
	⇒ Mischung zunächst fertig stellen!		
+	Primer A	1 µl	0,5 µM
+	Primer B	1 µl	0,5 µM
	⇒ Mischung zunächst fertig stellen! (Master Mix)		
	danach:	je 18 µl	in Glaskapillare vorlegen
+	Template DNA	2 µl	<1 µg/ Reaktion
	<b>Endvolumen</b>	<b>20 µl</b>	

### 3.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung von DNA

DNA-Lösungen sind häufig mit Proteinen verunreinigt. Durch die Phenol-Chloroform-Extraktion wird die DNA-Lösung von diesen Verunreinigungen befreit und entsalzt. Die Verunreinigungen werden denaturiert und sammeln sich in der unteren, organischen Phase und in der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an. Die Nukleinsäuren bleiben in der oberen, wässrigen Phase.

Die DNA-Lösung wird mit TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM EDTA) auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 50µl 50% (v/v) Phenol, 48% (v/v) Chloroform, 2% (v/v) Isoamylalkohol wird der Mix vorsichtig gevortext und anschließend 45 Sekunden bei 20.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die DNA enthält, wird bis zur Interphase vorsichtig abgenommen. Die untere, phenolhaltige Phase wird mit weiteren 50 µl TE-Puffer versetzt, wieder gevortext und ein weiteres Mal für 45 Sekunden bei 20.000 x g, RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird mit der wässrigen Phase der ersten Extraktion vereint (Gesamtvolumen ca. 100µl). Die phenolische Phase wird verworfen.

Zur Präzipitation der DNA wird die DNA-Lösung mit 0,1fachem Volumen 3M Natriumacetat (pH 6) und 2,5fachem Volumen absolutem Ethanol versetzt und bei -70°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation von 60 Minuten bei 20.000 x g, 4°C wird die sedimentierte DNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen (Rezentrifugation bei 20.000 x g, 4°C für 5 Minuten). Die Überstände werden verworfen. Die DNA wird im Inkubator bei 37°C getrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

### 3.1.4 Agarose- /LMP-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten von 0,5 bis 25 kb Länge werden Agarosegele in entsprechenden Konzentrationen von 0,5 bis 2,0% eingesetzt.

**TAE-Puffer:** 40mM Tris-Acetat; 2mM EDTA; pH 8.0; 0,5µg/ml EtBr  
**TAE-Puffer low EDTA :** 40mM Tris-Acetat, 0,1mM EDTA , pH 8.0  
(für direkte Elution von DNA aus dem Gel)

Zunächst wird die Agarose in TAE-Puffer unter Kochen gelöst. Nach Abkühlen der Flüssigkeit auf 50-60°C wird die Agarose in eine Gelkammer gegossen. Danach werden zur Formung der Geltaschen Kämme in die flüssige Agarose eingesetzt. Die Proben werden in die Taschen des Agarosegels gegeben, ebenso ein entsprechender Längenstandard (100bp DNA Ladder oder Lambda DNA/ *EcoRI* + *HindIII* Marker; siehe Anhang). Die Auftrennung der DNA erfolgt bei einer Spannung von 100 bis 200V (ideal 5V pro cm). Unter UV-Licht bei 360nm können DNA-Banden ab ca. 20ng im Gel identifiziert und fotografiert werden.

Für die Aufreinigung von DNA aus Gelen nach Gelelektrophorese eignet sich ein LMP (low melting point)-Agarose-Gel. LMP-Agarose schmilzt bereits bei 65°C und nicht wie normale Agarose erst bei 90°C (Mülhardt, 2003). Somit ist die LMP-Agarose für die Aufreinigung der DNA aus der Agarose besonders gut geeignet, da es sich bei der Schmelztemperatur der LMP-Agarose um einen Temperaturbereich handelt, in dem die DNA noch nicht denaturiert. Um die DNA aus dem Gel zu isolieren, wird zuerst ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Nach dem Erstarren des Gels wird unterhalb der Geltaschen ein Bereich aus dem Gel herausgeschnitten, in dem die durch Aufkochen verflüssigte LMP-Agarose gegossen wird. Nachdem die LMP-Agarose ebenfalls erstarrt ist, kann das Gel mit den DNA-Proben und einem Längenstandard beladen werden. Die Elektrophorese wird bei einer geringen Spannung von 90 bis 125V durchgeführt, da bei einer höheren Spannung die entstehende Wärmeentwicklung ein Schmelzen der LMP-Agarose verursachen könnte.

### 3.1.5 Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose

Für die Reinigung von DNA werden die DNA-Fragmente zunächst in einem LMP-Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.1.4). Unter UV-Licht kann die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Dieser Vorgang sollte möglichst schnell erfolgen, da DNA sehr empfindlich auf UV-Licht reagiert und es beispielsweise zu Depurinierungen, Bildung von Basendimeren oder zu Strangbrüchen kommen kann. Die Isolierung und Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück erfolgt mit Hilfe des High Pure Product Purification Kits von Roche.

#### 3.1.5.1 High Pure PCR-Product Purification Kit (Roche)

In Gegenwart eines chaotropen Salzes werden Nukleinsäuren an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden. Die Bindungsreaktion wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und deren Interaktion mit den gelösten Nukleinsäuren ausgelöst. Da nur die Nukleinsäuren an das Säulenmaterial gebunden werden, können durch einen Waschvorgang andere Stoffe, Verunreinigungen wie Salze, nicht abgetrennte Primer, freie Nukleotide und Proteine, Mineralöl und thermostabile Polymerasen abgetrennt werden. Diese könnten nachfolgende enzymatische Reaktionen hemmen. Die Mindestlänge der zu bindenden DNA muss 100bp sein. Durch einen Elutionsvorgang mit Niedrigsalzpuffer oder Wasser kann dann die gereinigte DNA wieder gelöst werden und steht für Klonierungsexperimente, Markierungsreaktionen oder DNA-Sequenzierungen zur Verfügung.

**Bindungspuffer:** 3M Guanidin-Thiocyanat; 10mM Tris-HCl; 5% (v/v) Ethanol; pH 6.6

**Waschpuffer:** 20mM NaCl; 10mM Tris-HCl; 80% (v/v) Ethanol; pH 7.5

**Elutionspuffer:** 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8.0

Zu 100mg Gel werden 300µl Bindungspuffer gegeben. Bei größeren Mengen an Gel muss die Menge an Bindungspuffer proportional erhöht werden. Um die Bestandteil des Gels vor der eigentlichen Reinigung der DNA zu lösen, wird der Ansatz 15 Minuten bei 56°C inkubiert, alle 2-3 Minuten gevortext und nach Abkühlen mit 150µl Isopropanol/100mg Gel versetzt.

Nach Einsetzen des High Pure Filtrationsgefäßes in ein Auffanggefäß wird die Probe in das obere Reservoir einpipettiert und anschließend bei 13.000 x g 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen, in das obere Reservoir werden 500µl Waschpuffer gegeben und der Ansatz erneut bei 13.000 x g 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wird wieder verworfen, die DNA wird ein zweites Mal nun mit 200µl Waschpuffer gewaschen, dadurch erfolgt eine optimale Reinigung und eventuelle Waschpufferreste werden entfernt. In ein neues Auffanggefäß wird dann nach Aufgabe von 50µl (max. 100µl) 60°C-warmen Elutionspuffer und Zentrifugation bei 13.000 x g 30 Sekunden die DNA eluiert. Durch einen zweiten Elutionsschritt kann die DNA-Ausbeute erhöht werden. Die Eluate beider Elutionsschritte werden vereinigt, das Gesamtvolumen bei Einsatz von je 2 x 50µl Elutionspuffer beträgt letztlich ungefähr 90µl. Durch Alkoholpräzipitation (siehe 3.1.3) kann das Eluat konzentriert werden.

### 3.1.6 Restriktion von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA geschnitten werden. Diese Enzyme erkennen spezifisch vier bis acht Basenpaare einer DNA-Sequenz, die in der Regel eine spiegelsymmetrische Achse besitzt, ein so genanntes Palindrom. Bei Erkennung der Basenabfolge lösen Restriktionsendonukleasen die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden, so dass DNA-Enden mit einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe

entstehen. Die Spaltung kann abhängig vom eingesetzten Enzym in überhängenden Enden (sticky ends) oder stumpfen Enden (blunt ends) resultieren. Enden, die wieder miteinander Basenpaarungen ausbilden können, werden als kompatibel bezeichnet. Spaltungen von DNA mit Restriktionsendonukleasen werden in der Regel in Reaktionspuffer mit 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM DTT und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung richtet sich nach dem eingesetzten Enzym.

DNA wird oft gleichzeitig mit zwei verschiedenen Enzymen, die sticky ends produzieren, als Doppelverdau gespalten. So entstehen bei der Spaltung von Vektoren lineare DNA-Moleküle, die aufgrund der unterschiedlichen Enden nicht religieren können. Für eine Ligation werden die einzubauenden Inserts ebenfalls im Doppelverdau gespalten, so dass deren Enden zu denen des Vektors komplementär sind und eine gerichtete Ligation stattfindet.

Für einen Standard-Restriktionsverdau werden bei einem Endvolumen von 20µl maximal 4µg DNA, 2µl 10x Restriktionspuffer, 1µl BSA (2mg/ml) und 5-10Units Enzym eingesetzt. Der Ansatz wird mit Wasser auf ein Endvolumen von 20µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C, bei der Restriktion von Vektoren für 2 bis 4 Stunden und bei der Restriktion von Inserts über Nacht. Anschließend werden die Spaltprodukte durch Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt und gefällt (siehe 3.1.3). Zur Beurteilung der Spaltung kann ein Aliquot auf ein 1%iges Agarosegel (siehe 3.1.4) aufgetragen werden.

### 3.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Phosphatreste der 5'-Enden der DNA-Fragmente werden durch eine Phosphatase entfernt (Dephosphorylierung). Dadurch wird die Religation eines Vektors nach dem Restriktionsverdau verhindert. Für eine erfolgreiche Klonierung reichen die beiden 5'-Phosphatreste des Inserts aus, um dieses mit dem dephosphorylierten Vektor zu ligieren.

Zur Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden wird die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) eingesetzt. Für die Reaktion werden zu 5µg der zu dephosphorylierenden DNA 1-2Units SAP gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung des Enzyms wird der Ansatz mit Phenol-Chloroform extrahiert und gefällt (siehe 3.1.3).

### 3.1.8 Ligation von DNA

Bei der Ligation kommt es zur Ausbildung von Phosphodiesterbildungen zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe. Katalysiert wird diese Reaktion von der DNA-Ligase. Für die Ligation werden zunächst 2µl TE-Puffer, der Vektor (1µl) und das Insert, das in 5µl TE-Puffer gelöst vorliegt, zusammengegeben und für 2 Minuten bei 56°C und anschließend für 1 Minute auf Eis inkubiert. Dann werden 1µl 10x Ligationspuffer (Promega) und 1µl T4-DNA-Ligase (3U/µl; Promega) zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Der Ansatz wird über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 3.1.9 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wird das von der Firma PE Applied Biosystems entwickelte Sequenzierungskit verwendet. Darin enthalten sind die AmpliTaq DNA-Polymerase und die 2',3'-Dideoxynukletide (ddNTPs), an die vier Fluorescein- und Rhodamin-Derivate gekoppelt sind, die eine Detektion bei verschiedenen Wellenlängen erlauben. Die AmpliTaq DNA-Polymerase ist eine Variante der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* mit einer Punktmutation im aktiven Zentrum. Diese Mutation führt zu einer verringerten Unterscheidungsfähigkeit zwischen dNTPs und ddNTPs und ermöglicht somit den Einbau der ddNTPs durch die PCR-Reaktion, wodurch es zum Strangabbruch kommt. So entstehen eine Vielzahl von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten mit spezifischen ddNTPs am 3'-OH-Ende. Über eine Gelkapillare am ABI Prism



310 Genetic Analyzer werden die DNA-Fragmente aufgetrennt, detektiert und der Basenabfolge zugeordnet. Durch eine weitere Mutation im aminoterminalen Ende der AmpliTaq DNA-Polymerase ist außerdem die 5'→3'-Nuklease-Aktivität eliminiert.

Für die Sequenzierungsreaktion wird ein Reaktionsmix aus 4µl Ready-Mix (AmpliTaQ, ddNTPs, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und Tris-HCl-Puffer pH 9.0), 4µl 5'-3'-Primer (0,8pmol/µl), 4µl 5x-Puffer, 3µl DNA (0,2µg/µl) und 5µl H<sub>2</sub>O in einem 0,2ml-MicroAmp PCR-Gefäß gemischt.

#### PCR-Programm:

0:30 min.	96°C	} 25 Zyklen
0:15 min.	x° C	
4:00 min.	60°C	
∞	15°C	

Zu dem PCR-Produkt werden 150µl einer Präzipitationslösung gegeben, die aus 20µl H<sub>2</sub>O, 4µl 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 100µl absolutem Ethanol besteht. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wird die Lösung gemischt und bei 3.000 x g 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit einer Kapillare abgenommen und 150µl 70%iges Ethanol zum Waschen hinzugefügt. Es wird erneut zentrifugiert mit 3.000 x g 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wird wiederum mit einer Kapillare entfernt und das Pellet bei 37°C in der PCR-Maschine getrocknet. Dann werden 12,5µl Template-Suppression Reagent (PE Applied Biosystems) zugesetzt und das Pellet resuspendiert. Nach 2 Minuten Inkubation bei 95°C wird die Probe im Eis abgekühlt und in ein ABI-Probengefäß überführt. Die DNA-Probe kann mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer sequenziert werden.

#### 3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Über die Messung der optischen Dichte (OD-Messung) mit einem Photometer kann die Konzentration einer Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Die Nukleinsäurekonzentration berechnet sich aus der optischen Dichte bei 260nm, einem für DNA beziehungsweise für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor, der bei RNA 40 und bei dsDNA 50 beträgt, und der eingesetzten Verdünnung (z.B.: DNA-Konzentration [µg/ml] = OD<sub>260</sub> x Verdünnungsfaktor x 50). Die Konzentrationsbestimmung erfolgt als Doppelbestimmung mit einer 1:100- oder 1:200-Verdünnung der Nukleinsäurelösung. Außerdem kann aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260nm und der OD bei 280nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Dieses Verhältnis beträgt bei proteinfreien Nukleinsäurelösungen 1,8 bis 2,0.

#### 3.1.11 Isolierung von RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA oder für die gleichzeitige Isolierung der RNA, der DNA und von Proteinen aus Zellen wird TRI-Reagent<sup>®</sup> LS (RNA/DNA/Protein Isolation Reagent for Liquid Samples, Molecular Research Center, Inc., Kat. Nr., TR-118) eingesetzt. Dieses Reagenz basiert auf der Single-Step RNA-Isolationmethode (Chomczynski und Sacchi, 1987), bei der Guanidinthiocyanat (GTC) und Phenol für die Lysierung der Zellen und gleichzeitiger Inaktivierung endogener RNAsen zum Einsatz kommen. GTC ist ein chaotropes Salz, das Proteine denaturiert und inaktiviert, ebenso RNAsen. Durch das Phenol werden die Proteine entfernt und durch die Absenkung des pH-Wertes lösen sich auch kleinere DNA-Fragmente im Phenol. Die größeren DNA-Fragmente sammeln sich nach der Zentrifugation in der Interphase. Die RNA dagegen befindet sich in der wässrigen Oberphase.

Zunächst werden die Zellen in kleinen Flaschen kultiviert. Zum gewünschten Zeitpunkt werden die Zellen nach Absaugen des Mediums und einem Waschschrift mit PBS mit TRI-Reagent® LS für mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen suspendiert. Das Lysat wird in ein Eppendorfgefäß überführt und kann bei -70°C gelagert werden.

Zur Abtrennung der RNA von Proteinen und DNA wird das Lysat mit 100µl 1-Brom-3-Chlorpropan (BCP) versetzt, 15 Sekunden geschüttelt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 20.000 x g, 4°C, 15 Minuten entstehen 2 Phasen; eine wässrige Phase, die die RNA enthält, und eine organische Phase (phenolhaltig) mit Proteinen. In der Interphase befindet sich die genomische DNA der Zellen. In 200µl-Schritten wird die obere RNA-haltige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wird für 30 Minuten bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Kapillare entfernt und das Pellet zweimal mit 500µl -20°C-kaltem 80% Ethanol/ 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Es wird jeweils für 15 Minuten bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet bei 37°C getrocknet, in 20-50µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und für 15 Minuten bei 58°C inkubiert. Die Konzentration der RNA wird über Messung der optischen Dichte bei 260nm bestimmt ( $O.D._{260\text{ nm}} \cdot x \text{ (Verdünnung)} \cdot 40 = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; siehe 3.1.10). Die RNA kann bei -70°C gelagert werden.

### 3.1.12 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgt nach der modifizierten Methode von Gubler und Hoffmann (1983). Der Anteil an mRNA an der zellulären Gesamt-RNA beträgt nur ungefähr 1 bis 2%. Allerdings weisen nahezu alle eukaryotischen mRNAs am 3'-Ende eine längere poly(A)-Sequenz auf, die es erlaubt, mRNA aus RNA-Präparationen durch den Einsatz von Oligo-(dT)<sub>12-18</sub>-Primern und einer reversen Transkriptase anzureichern und in cDNA umzuschreiben.

Es werden 2µg bis 7,5µg der gesamten RNA mit DEPC-behandeltem Wasser versetzt, so dass das Endvolumen 11,6µl beträgt. Nach Zugabe von 1µl Oligo-(dT)<sub>12-18</sub>-Primern (0,5µg/µl) wird die RNA bei 70°C für 10 Minuten denaturiert. Durch diesen Vorgang werden Sekundärstrukturen in der RNA aufgelöst. Anschließend wird der Ansatz für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dann werden 4µl 5fach RT-Puffer, 2µl 0.1 M DTT, 1µl dNTP (je 10 mM) und 0,4µl RNasin® (RNase-Inhibitor, 40 U/µl) zum Ansatz gegeben und dieser 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1µl reverse Transkriptase M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase; 200 U/µl) wird die reverse Transkription bei 37°C für 90 Minuten gestartet. Nach einer Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 10 Minuten bei 92°C, wird der Ansatz mit 40µl TE-Puffer versetzt. Die cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

### 3.1.13 Klonierung von PCR-Produkten

Bei einer Klonierung wird ein DNA-Abschnitt in einen Vektor eingebaut. Dazu muss das zu klonierende DNA-Fragment in ausreichender Menge (Klonierungs-PCR, siehe 3.1.13.1) und Reinheit vorliegen. Vor der Einführung des DNA-Fragmentes in den Vektor müssen beide mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut werden (siehe 3.1.6), um kompatible Enden für eine Ligation zu erhalten (siehe 3.1.8). Nach Transformation des Vektorkonstruktes in kompetente Zellen (siehe 3.2.3) wird der DNA-Abschnitt vermehrt. Mit Hilfe eines PCR-Screens (siehe 3.1.13.2) können positive Klone selektiert, isoliert und vermehrt werden. Die Plasmid-DNA kann nun über eine Mini-Präparation (siehe 3.2.5) gereinigt und anschließend sequenziert (siehe 3.1.9) werden, um eventuelle Mutationen auszuschließen.

### 3.1.13.1 Klonierungs-PCR

Bei der Klonierungs-PCR wird anders als bei den bisherigen beschriebenen Polymerasekettenreaktionen nicht die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Dieses Enzym besitzt zwar eine hohe Syntheserate von ungefähr 2.800 Basen pro Minute (bei 70°C) und ist bei 94°C noch sehr stabil, allerdings besitzt die Taq-Polymerase keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und somit keine proof reading-Funktion. Daher ist bei diesem Enzym die Fehlerrate mit ca. einem Fehler pro 10<sup>5</sup> Basen relativ hoch. Außerdem hat die Taq-Polymerase die Eigenschaft, unabhängig von der DNA-Matrize ein Nukleotid am 3'-Ende des synthetisierten Stranges anzufügen, im Allgemeinen ein Adenosin. Daher werden für die Klonierungs-PCR die hitzestabilen DNA-Polymerasen Turbo-Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) und Herculanse<sup>®</sup> Enhanced DNA-Polymerase genutzt. Diese Enzyme besitzen eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die es ihnen erlaubt, falsch eingebaute Basen sofort wieder abzubauen. Dadurch sinkt die Fehlerrate um den Faktor 10. Allerdings besitzen die Turbo-Pfu-Polymerase und die Herculanse-Polymerase im Vergleich zur Taq-Polymerase eine geringere Syntheserate, weswegen die Dauer der einzelnen Zyklusschritte entsprechend verlängert werden muss. Dabei hängt die Dauer der DNA-Synthesephase aber auch von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes ab.

#### PCR-Ansatz für die Klonierung (50µl):

5,0µl	10x-Puffer Turbo-Pfu/ Herculanse
1,0µl	dNTP (10mM)
3,0µl	Primermix (5µM)
2,0µl	Template-DNA (10ng/µl)
0,5µl	Turbo-Pfu-Polymerase/ Herculanse-Polymerase
38,5µl / 33,5µl	H <sub>2</sub> O
--- / 5,0µl	DMSO

#### Turbo-Pfu-Polymerase PCR-Programm:

1:00 min.	94°C	} 35 Zyklen	
1:00 min.	94°C		
1:00 min.	x °C		
y min.	72°C		
15:00 min.	72°C		
∞	15°C		

x = Annealingtemperatur der entsprechenden Primer  
y = 1 min/ 1000bp

#### Herculanse-Polymerase PCR-Programm:

2:00 min.	92°C	} 35 Zyklen	
0:30 min.	92°C		
0:30 min.	x °C		
y min.	72°C		
15:00 min.	72°C		
∞	15°C		

x = Annealingtemperatur der entsprechenden Primer  
y = 1 min/ 1000bp

### 3.1.13.2 PCR-Screen

Für einen PCR-Screen werden pro Transformationsansatz 24 Klone von entsprechenden Agaroseplatten gepickt. Dabei wird jeder Klon zunächst auf einer Masterplatte ausgestrichen und anschließend in ein Probengefäß für die PCR gegeben, in der ein Mix aus 13,5µl H<sub>2</sub>O, 2µl 10x Puffer, 2µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,4µl dNTPs (10mM), 1µl forward Primer (5µM), 1µl reverse Primer (5µM) und 0,1µl Taq-Polymerase vorgelegt wurde. Das PCR-Programm entspricht den unter 3.1.1 angegebenen Standardbedingungen für eine PCR.

### 3.2 Mikrobiologische Methoden

#### 3.2.1 Lösungen und Medien

<b>Ampicillin-Stammlösung:</b>	50mg/ml Ampicillin in 70%igem Ethanol
<b>Kanamycin-Stammlösung:</b>	50mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>Tetracyclin-Stammlösung:</b>	50mg/ml in 70%igem Ethanol
<b>Doxycyclin-Stammlösung:</b>	1mg/ml Doxycyclin in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
<b>LB-Medium:</b>	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Hefeextrakt; 5g/l NaCl
<b>SOB-Medium:</b>	20g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,58g/l NaCl (10mM); 0,19g/l KCl (2,5mM); MgCl <sub>2</sub> (10mM); 1,2g/l MgSO <sub>4</sub> (10mM)
<b>SOC-Medium:</b>	3,6g/l Glucose (20mM) in SOB-Medium

#### 3.2.2 Bakterienstämme

<b><i>E.coli</i> SURE:</b>	(Stop Unwanted Rearrangement Events), (Greener, 1990); recB, recJ, sbcC201, uvrC, umuC: Tn5(kan <sup>R</sup> ), mcrA, mcrB, mrr lac, Δ (hsdRMS), endA1, gyrA96, thi, supE44 [F', proAB, lacIqZ Δ M15 FN10 (tet <sup>R</sup> )], Tetracyclin-resistent
<b><i>E. coli</i> Wk6λ:</b>	λ-lysogen, temp <sup>-</sup> , Δ (lac-proAB) gal E, str A, [F' lac I <sup>q</sup> , ZΔM15, pro A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> ]
<b><i>E.coli</i> DH5α:</b>	Fϕ80dlacZDM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), gal <sup>-</sup> , phoA, supE44, I <sup>-</sup> , thi-1, gyrA96, relA1

#### 3.2.3 Herstellung elektrokompenter Zellen

Von einer Agarplatte mit *E.coli* SURE beziehungsweise *E.coli* DH5α oder *E.coli* Wk6λ wird mit einer Impfföse eine einzelne Bakterienkolonie gepickt und in 2 ml LB-Medium überführt. Anschließend wird die angeimpfte Bakterienkultur über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Von der gesättigten Übernachtskultur werden 800μl zu 800ml LB-Medium und 3,2ml Tetracyclin-Lösung in einen 2 Liter-Kolben mit Schikanen gegeben. Die Bakterien werden bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Zwischenzeitlich wird von der Bakteriensuspension der OD-Wert bei 600 nm im Photometer bestimmt. Wird ein OD-Wert von ca. 0,6 erreicht, hat die exponentielle Wachstumsphase ihr Ende erreicht und die Inkubation wird beendet, indem jeweils 400ml der Bakteriensuspension in vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und 30 Minuten auf Eis unter gelegentlichem Schwenken der Becher inkubiert werden. Anschließend können die Bakterien in einer Kühlzentrifuge mit vorgekühltem GS-3-Rotor durch 13minütige Zentrifugation bei 3500 rpm (2070 x g) bei 4°C als Pellet abgetrennt werden. Die Bakterien (Pellets) werden in insgesamt 400ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und anschließend ein zweites Mal 13 Minuten bei 3500 rpm (2070 x g), 4°C abzentrifugiert. Die Bakterienpellets werden dann in insgesamt 400ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und ein drittes Mal abzentrifugiert. Das Pellet wird in 15ml 10%igem Glycerin aufgenommen und in einen kleinen Zentrifugenbecher überführt (SS-34-Röhrchen). Die Bakterien werden dann im SS-34-Rotor 15 Minuten bei 3500 rpm (2000 x g) bei 4°C abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das weiße Pellet in insgesamt 2ml Glycerin resuspendiert. Von dieser Bakterienstammlösung werden 50μl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.2.4 Transformation von kompetenten Zellen mittels Elektroporation

Als Transformation wird bei Bakterien das Einbringen von DNA in kompetente Zellen bezeichnet. Dieses wird mit Hilfe der Elektroporation erreicht. Bei dieser Methode wird die DNA mit einer Bakterienstammlösung (siehe 3.2.3) gemischt und unter hoher Spannung (mehrere 1000 V) kurz einem elektrischen Puls ausgesetzt. Die Feldstärke des elektrischen Feldes nimmt exponentiell ab, dadurch kann die Membran von Zielzellen depolarisiert werden: es entstehen Löcher in der Membran. Durch diese können die einzuschleusenden DNAs, aber auch andere Makromoleküle in das Zellinnere gelangen. Nach Regeneration der Zellmembran verfügt man dann wieder über lebensfähige Zellen, die nun die dauerhaft integrierte, neue DNA aktiv exprimieren können. Die Transformationsrate bei Transformation mittels Elektroporation beträgt  $10^7$  bis  $10^{10}$  Transformanten pro  $1\mu\text{g}$  DNA.

### 3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem JETSTAR-System®

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Birnboim und Doly (1979). Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wird das JETSTAR Novel Plasmid Purification System von der Firma GENOMED verwendet. Das Reinigungssystem setzt eine modifizierte alkalische/SDS-Methode ein, um klare Lysate zu erhalten. Nach Neutralisation wird das Lysat auf eine JETSTAR-Säule (Mini, Midi oder Maxi) gegeben und die Plasmid-DNA kann an die Anionenaustauschersäule binden. Durch einen Waschschrift werden RNA und andere Verunreinigungen entfernt. Anschließend wird die gereinigte Plasmid-DNA von der Säule eluiert und durch Alkohol-Präzipitation konzentriert.

<b>Zellsuspensionspuffer:</b>	50mM Tris; 10mM EDTA, pH 8.0; 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase
<b>Lysepuffer:</b>	200mM NaOH; 1% SDS (w/v)
<b>Neutralisationslösung:</b>	3.1M Kaliumacetat; pH 5.5
<b>Equilibrierungslösung:</b>	600mM NaCl; 100mM Natriumacetat; 0,15% TritonX-100; pH 5.0
<b>Waschpuffer:</b>	800mM NaCl; 100mM Natriumacetat; pH 5.0
<b>Elutionspuffer:</b>	1500mM NaCl; 100mM Natriumacetat; pH 8.5

Es werden von einer Agarplatte Einzelkolonien des transformierten *E.coli* gepickt und diese in eine entsprechende Menge LB-Medium (Mini: 2,3ml, Midi: 25ml, Maxi: 250ml), dem ein Antibiotikum zur Selektion zugesetzt wird, über Nacht bei 37°C auf einem Kulturschüttler (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur 15 Minuten bei 6.000 x g (Mini: in zwei Schritten je 2 Minuten bei 10.000 x g) zentrifugiert. Das Pellet wird mit Zellsuspensionspuffer (Mini: 0,4ml; Midi: 4ml; Maxi: 10ml) resuspendiert. Nach Zugabe von Lysepuffer (Mini: 0,4ml; Midi: 4ml; Maxi: 10ml) und Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wird die Neutralisationslösung unter Schwenken hinzugefügt (Mini: 0,4ml; Midi: 4ml; Maxi: 10ml). Anschließend wird 15 Minuten bei 15.800 x g (Mini: 11 Minuten bei 20.000 x g) zentrifugiert. Danach wird der DNA-haltige Überstand auf die zuvor mit Equilibrierungslösung behandelte Säule (Mini: 2ml; Midi: 10ml; Maxi: 30ml) gegeben. Die Säule wird mit Waschpuffer gewaschen (Mini: 2x 2,5ml; Midi: 2x 10ml; Maxi: 60ml) und die gebundene Plasmid-DNA anschließend mit 50°C-warmen Elutionspuffer eluiert (Mini: 0,9ml; Midi: 5ml; Maxi: 15ml). Die Präzipitation der DNA erfolgt mit dem 0,7fachen Volumen an Isopropanol und Inkubation von 30 bis 40 Minuten auf Eis. Dann wird für 30 Minuten bei 4°C und 15.000 x g (Mini: 20.000 x g) zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, 15 Minuten zentrifugiert (Mini: 2 Minuten), bei 37°C getrocknet und in einem gewünschten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA-Lösung kann über die Messung der optischen Dichte ermittelt werden (siehe 3.1.10).

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Isolierung von Proteinen

Um Proteine aus Zellen zu isolieren, die in kleinen Flaschen kultiviert wurden, wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Durch Zusatz von 1ml TEP lösen sich die Zellen vom Flaschenboden. Die Trypsinierung wird mit 4ml Medium gestoppt und die Zellsuspension wird in 15ml-Falconröhrchen überführt. Zum Pelletieren der Zellen wird die Zellsuspension 5 Minuten bei 320 x g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

**Lysepuffer:** 20mM Tris pH 7.5; 150mM NaCl; 2mM EDTA; 1% (w/v) NP-40; 50mM NaF; 1mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; (durch Zugabe von ¼ Protease-Inhibitortablette und 2,5µl 100µM Okadaic Acid pro 2,5ml vervollständigen)

Jedes Zellpellet wird in 60µl bis 200µl Lysepuffer resuspendiert. Die Zelllysate werden 10 Minuten bei 20.800 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und kann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

#### 3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Analyse von Proteingemischen und ermöglicht eine schnelle Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen. Die meisten Proteine binden SDS (Natriumdodecylsulfat) und führen so zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. SDS ist in der Lage, die Proteine zu denaturieren, was besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT zur Wirkung kommt, und unterbindet somit Protein-Protein-Wechselwirkungen wie Quartärstrukturen. Dadurch werden die verschiedenen Proteine im SDS-Gel lediglich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zum Pluspol. Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (Lämmli, 1970) werden die Proteine zunächst im großporigen Sammelgel ohne Molekularsiebeffekt konzentriert und anschließend im Trenngel mit geringerer Porengröße und auftretendem Molekularsiebeffekt ihrer Größe nach aufgetrennt.

<b>PAA:</b>	30% (w/v) Polyacrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid in H <sub>2</sub> O (Rotiphorese Gel 30, Roth)
<b>SDS (10%):</b>	10% (w/v) Natriumdodecylsulfat
<b>Laufpuffer (8fach):</b>	1,85M Tris; 0,67M Glycin; 8% (v/v) SDS (10%); 16mM EDTA; pH 8.8
<b>APS:</b>	40% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H <sub>2</sub> O
<b>Lower Tris:</b>	1,5M Tris; 0,4 (w/v) SDS; pH 8.8
<b>Upper Tris:</b>	0,5M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6.7
<b>4x Probenpuffer (red.):</b>	2,581 ml Upper Tris; 0,516g SDS; 7ml Glycerin (87%); 0,1788g DTT, auf 10 ml Endvolumen mit H <sub>2</sub> O auffüllen, mit Bromphenolblau versetzen
<b>Trenngel (10%):</b>	3,3ml PAA; 2,5ml Lower Tris; 4,1ml H <sub>2</sub> O; 8µl TEMED; 12µl APS
<b>Trenngel (12,5%):</b>	4,1ml PAA; 2,5ml Lower Tris; 3,2ml H <sub>2</sub> O; 8µl TEMED; 12µl APS
<b>Trenngel (15%):</b>	5 ml PAA; 2,5ml Lower Tris; 2,4ml H <sub>2</sub> O; 8µl TEMED; 12µl APS

<b>Sammelgel:</b>	1,4ml PAA; 2ml Upper Tris; 4,2ml H <sub>2</sub> O; 10µl TEMED; 16µl APS
<b>Längenstandard:</b>	Full Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences)

Nach Aufbau der Gelkassette (Geldicke 1 mm) mit Abdichtgummi wird das Trenngel in die Kammer gegeben (ca. 4/5 voll) und dieses mit ein wenig Wasser überschichtet, so dass eine glatte Oberfläche entsteht. Das APS initiiert die Acrylamidpolymerisation, TEMED ist der Katalysator für diese Reaktion. Nach Polymerisation des Trenngels wird das Wasser abgegossen. Die Kassette wird anschließend bis zum oberen Rand mit der Sammelgel-Lösung gefüllt. In das noch flüssige Sammelgel wird der Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wird das Abdichtgummi der Gelkammer entfernt und diese in eine mit 1fach Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wird der Kamm entfernt. Bevor die Protein-Proben auf das SDS-Gel aufgetragen werden können, müssen sie mit einem 4fach reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt werden, der 1 bis 2% frisch zugesetztes Mercaptoethanol enthält. Des Weiteren werden die Proben und der Größenstandard 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben können diese auf das Gel aufgetragen werden. Zunächst wird eine Spannung von 75V angelegt und später, nachdem die Proben im Trenngel sind, wird die Spannung auf bis zu 150V erhöht. Erreicht der Probenpuffer den unteren Rand des Gels, wird die Elektrophorese beendet und das Gel aus der Gelkassette genommen. Die Proteine können nun durch einen Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert werden (siehe 3.3.3).

### 3.3.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine des SDS-Polyacrylamid-Gels auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Millipore®; 0,45µm) übertragen und können dann immunmarkiert werden.

**Blotpuffer:** 25mM Tris; 192mM Glycin; 20% (v/v) Methanol

Nach Aufbau des Blot-Sandwiches wird dieser in die Tankblot-Apparatur (Hoefer/ AP-Biotech) eingesetzt, so dass sich der Pluspol auf der Seite der Membran und der Minuspol auf der Seite des Gels befinden. Der Transfer verläuft vom Minus- zum Pluspol bei 80V. Nach 180 Minuten kann der Transfer beendet und die Membran aus der Kammer entnommen werden. Die transferierten Proteine können jetzt immunmarkiert werden.

#### 3.3.3.1 Immunmarkierung und Entwicklung

<b>TBS:</b>	0,08% (w/v) NaCl; 0,002% KCl; 5mM Tris-HCl pH 7.4
<b>T-TBS:</b>	0,1% (w/v) Tween20® in TBS
<b>Blockierungslösung:</b>	10ml 0,1% H-Milch oder 5% BSA (w/v) in T-TBS
<b>Substratlösung:</b>	ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)

**Tabelle 3:** Verwendete primäre Antikörper im Western Blot

Antikörper	Beschreibung
Anti-Flag <sup>®</sup> M2 Monoclonal Antibody	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus; bindet an Flag-Epitope (DYKDDDDK) (Sigma)
HA-probe (Y-11): sc-805	Polyklonaler IgG-Antikörper aus Kaninchen; bindet an HA-Epitope (YPYDVPDYA) (Santa Cruz Biotechnology)
Human Osteoblast Specific Factor-2 (OSF-2, Periostin, Fascilin-I like)	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Acris)
Anti-Kollagen Typ III	Polyklonaler IgG-Antikörper aus dem Kaninchen (Calbiochem)
Anti-Green Fluorescent Protein (GFP)	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Chemicon)

**Tabelle 4:** Verwendete sekundäre Antikörper im Western Blot

Antikörper	Beschreibung
Goat anti mouse IgG-Antibody (H+L)	Peroxidase-konjugiert; aus der Ziege; erkennt die schwere und leichte Kette eines Maus-IgG-Antikörpers (Jackson Immuno Research/Dianova)
Goat Anti-Rabbit IgG-Antibody (H+L)	Peroxidase-konjugiert; aus der Ziege; erkennt die schwere und leichte Kette eines Kaninchen-IgG-Antikörpers (Jackson Immuno Research/Dianova)

Zunächst wird die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen für 10 Minuten in TBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken in der Blockierungslösung inkubiert. Der primäre Antikörper kann entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken der Membran in Blockierungslösung inkubiert werden. Nach Waschen der Membran mit T-TBS (dreimal 10 Minuten) wird der sekundäre Antikörper in Blockierungslösung ebenfalls für 1 Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wird wiederum dreimal 10 Minuten mit T-TBS gewaschen. Anschließend wird durch Zugabe der Substratlösung die Detektion des gebundenen peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpers ermöglicht. Es handelt sich dabei um eine durch die Substratlösung katalysierte Reaktion mit dem an den Antikörper gekoppelten Enzym. Durch die Oxidation des Chemilumineszenz-Substrates kommt es zu einer Lichtemission, die auf einem Röntgenfilm erfasst werden kann.

### 3.3.4 RNA-Gelelektrophorese und Northern Blot

Beim Northern Blot werden gelelektrophoretisch getrennte RNA-Moleküle auf einer Membran fixiert, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden spezifische Sequenzen nachweisen zu können.

#### 3.3.4.1 Lösungen und Puffer

<b>DEPC-H<sub>2</sub>O:</b>	0,1% DEPC in dest. H <sub>2</sub> O; über Nacht bei 37°C schütteln; 2 x autoklavieren
<b>10 x MOPS-Puffer:</b>	200 mM 3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure; 10mM EDTA; 10mM NaAc; pH 7.05; sterilfiltrieren



<b>RNA-Probenpuffer:</b>	250µl deionisiertes Formamid; 83µl 37% Formaldehyd (v/v); 50µl 10x MOPS-Puffer; 50µl Glycerin; 10µl 2,5% Bromphenolblau (w/v); 57µl DEPC-H <sub>2</sub> O
<b>20x SSC:</b>	3 M NaCl; 0,3 M Citrat; pH 7.0-7.5; autoklavieren
<b>Heringssperma-DNA:</b>	10 mg/ml (11,6 mg + 1160µl H <sub>2</sub> O, 15 Minuten bei 95°C lösen)
<b>DNA-Verdünnungspuffer:</b>	50µg/ml Heringssperma-DNA in TE
<b>0,5 M EDTA:</b>	46,53 g/250 ml, pH 8.0 mit 10 M NaOH einstellen
<b>10% SDS:</b>	25g/250ml, filtrieren
<b>Elektrophoresepuffer:</b>	1 x MOPS-Puffer, 2 mM EDTA, pH 8.0

#### 3.3.4.2 RNA-Probenvorbereitung

Für die Northern-Blot Analyse werden 5 µg der aus Zellen isolierten Gesamt-RNA (siehe 3.1.11) eingesetzt. Die RNA-Lösung wird mit 0,1%igem DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 4µl aufgefüllt. Übersteigt das Volumen der RNA-Lösung, in der sich 5µg Gesamt-RNA befinden diese 4µl bereits, so muss die RNA vorher präzipitiert werden. Dazu wird die RNA-Lösung zunächst mit 0,1%igem DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50µl aufgefüllt. Es werden 1/10 des Volumens 3M NaAc-Lösung (pH 5.7) und 2,5 Volumen absolutes Ethanol zu der Lösung gegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C wird der Überstand mit einer Kapillare abgenommen und die RNA-Pellets mit 500µl 80%igem Ethanol (mit 0,1%igem DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt) gewaschen. Nach Rezentrifugation für 15 Minuten bei 15.000 x g und 4°C wird der Überstand erneut abgenommen und die Pellets bei 37°C getrocknet. Anschließend werden die Pellets in 4µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zu den 4µl RNA-Lösung (5µg Gesamt-RNA) werden 16µl frisch angesetzter RNA-Probenpuffer gegeben, die Lösung wird gemischt und für 10 Minuten bei 65°C in Inkubator denaturiert. Anschließend werden die Proben für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, kurz runterzentrifugiert und mit 1,5 µl Ethidiumbromid (1µg/ml) versehen. Dann können die Proben auf ein vorbereitetes Formaldehyd-Gel für die Gelelektrophorese aufgetragen werden. Parallel zu den Proben werden 2µl des RNA-Längenstandards (RNA-Molecular Weight Marker I, Digoxigenin-markiert (0.3-0.9 kb, Roche) mit 16µl RNA-Probenpuffer versehen, ebenfalls 10 Minuten bei 65°C denaturiert, 2 Minuten auf Eis abgekühlt und runterzentrifugiert.

#### 3.3.4.3 RNA-Gelelektrophorese

Da RNA einzelsträngig ist und deshalb dazu neigt, Sekundärstrukturen auszubilden, welche die Laufeigenschaften der RNA verändern, muss sie unter denaturierenden Bedingungen getrennt werden. Deshalb ist die Zusammensetzung des Gels anders als bei der DNA-Gelelektrophorese und enthält Formaldehyd.

Zur Herstellung des Gels wird 1g Agarose in 72ml DEPC-H<sub>2</sub>O durch Kochen gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt ist, werden 10 ml 10x MOPS-Puffer und 18ml 37% Formaldehyd zugegeben, gemischt und in einen Gelträger gegossen.

Ist das Gel ausgehärtet, wird es in eine mit Elektrophoresepuffer (1x MOPS mit 2 mM EDTA, pH 8.0) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit den vorbereiteten RNA-Proben (3.3.4.2) beladen. Die Auftrennung der RNA erfolgt bei 100V.

Ist das Gel ausreichend weit gelaufen, wird es kurz in DEPC-Wasser gewaschen und unter UV-Licht bei 360 nm fotografiert. Anschließend kann der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran erfolgen.

#### 3.3.4.4 Transfer

Für den Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran wird das Gel zunächst erneut kurz mit DEPC-Wasser (5 Minuten) und

anschließend zweimal für 15 Minuten mit 10x SSC gewaschen. Der Blot erfolgt dann mit Hilfe eines Hochsalzpuffers, wobei unter Ausnutzung der Kapillarkräfte 10x SSC-Puffer durch das Gel und die Membran in einem Stapel von Papiertüchern gesogen wird. Dabei wandert die RNA mit und bleibt auf der Membran hängen. Der Transferstapel ist folgendermaßen aufgebaut: auf vier in 10x SSC eingeweichte und auf die Größe des Gels zugeschnittene 3MM-Filterkartons, die luftblasenfrei aufeinander gelegt wurden, wird ebenfalls luftblasenfrei das Gel platziert. Es folgt die Nylonmembran, die zuvor mit DEPC-H<sub>2</sub>O angefeuchtet und dann in 10x SSC gewaschen wurde. Auf die Nylonmembran werden vier Lagen in 10x SSC getränkte und darauf viele trockene Filterkartons gelegt. Darauf kommt eine Glasplatte, die mit einer zur Hälfte gefüllten 1-L Glasflasche beschwert wird. Die oberen feuchten Filterkartons werden 2-3 x alle 30 Minuten gegen trockene ausgetauscht, wobei die absichtlich angefeuchteten Filterkartons nicht ausgetauscht werden. Der Transfer erfolgt über Nacht. Nach dem Transfer wird die Membran kurz in 10x SSC, dann in DEPC-Wasser gewaschen (jeweils 5 Minuten) und getrocknet. Die Fixierung der RNA auf der Nylonmembran erfolgt durch die Bestrahlung mit UV-Licht (120mJ) mit einem Crosslinker (Stratgene), wodurch die RNA kovalent an die Membran gebunden wird (cross-linking). Die Membran kann nun mit einer entsprechenden, markierten Sonde hybridisiert werden.

### **3.3.4.5 DNA-Sondenherstellung**

Zur Identifikation bestimmter mRNAs auf der Membran werden spezifische, mit Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden eingesetzt.

Das DIG-System basiert auf dem Steroid Hapten Digoxigenin, das ein Aglukon des Steroids Digoxin ist, welches von einigen Digitalis Pflanzen hergestellt wird. Digoxigenin kann an Nukleotide wie dUDP oder UTP gekoppelt werden und leicht mit Hilfe von Polymerasen, wie der Klenow-Polymerase in Nukleinsäuren eingebaut werden. Die so generierten Sonden können dann für Hybridisierungen eingesetzt werden und mit Hilfe der an Anti-Digoxigenin Antikörper-gekoppelten alkalischen Phosphatase über eine Chemilumineszenz Reaktion detektiert werden.

Die Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonden erfolgt über das so genannte „random priming“. Hierbei wird die doppelsträngige DNA zunächst denaturiert und mit Zufallshexameren (random primers) hybridisiert, die dann als Primer für eine DNA-Polymerase dienen. Die Markierung erfolgt dabei durch den Einbau von radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierten Nukleotiden.

Für die Sondenherstellung werden 300ng der zu markierenden DNA eingesetzt und mit dest. Wasser auf 16µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die DNA wurde zuvor mittels PCR amplifiziert und gelgereinigt. Zur Denaturierung wird die DNA-Lösung für 10 Minuten bei 100°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach dem Zusatz von 4µl DIG-High Prime (Promega) wird die Probe gemischt, kurz zentrifugiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DIG-High Prime Mixtur enthält alle Reagenzien, die für eine random-prime Markierung notwendig sind: Klenow-Polymerase, Zufallsprimer, dNTPs und Digoxigenin-11-dUTP. Die Reaktion wird durch den Zusatz von 2µl 0,2M EDTA (pH 8.0) gestoppt und die DNA-Sonde kann bei -20°C gelagert werden. Bei einem Einsatz von 300ng DNA für die Markierung erhält man nach 20 Stunden Inkubation mit DIG-High Prime ca. 2.000ng DIG-markierte DNA (Herstellerangabe).

Die Markierung der hergestellten DNA-Sonde wird anschließend getestet. Dazu werden verschiedene Verdünnungen der Sonde (1:50-1:500.000) mit DNA-Verdünnungspuffer (50µg/ml Heringssperma-DNA in TE, 10 Minuten bei 95°C) hergestellt. 1µl jeder Verdünnung wird auf eine Nylonmembran pipettiert. Nachdem die Spots getrocknet sind, wird die Membran UV-fixiert und 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen, 30 Minuten mit Blockierungslösung und dann 30 Minuten mit Antikörper-Lösung (anti-DIG-Antikörper, 1:5000 in Blockierungslösung) inkubiert. Anschließend wird die Membran zweimal 15

Minuten mit Waschpuffer gewaschen und 5 Minuten mit Detektionspuffer inkubiert. Die Entwicklung erfolgt über eine Chemilumineszenz-Reaktion, bei der die an den anti-DIG-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase ein zugesetztes Substrat (CDP-Star Reagenz) umsetzt. Die Lichtemissionen werden auf einem Röntgenfilm aufgefangen, der anschließend entwickelt wird.

#### **3.3.4.6 Hybridisierung**

Die getrocknete, UV-fixierte Membran mit den kovalent gebundenen RNA Proben wird kurz in 0,1%igem DEPC-Wasser angefeuchtet und 30 Minuten unter leichtem Schütteln in vorgewärmter DIG-Easy-Hyb Lösung (ca. 20ml/100cm<sup>2</sup>) bei 50°C inkubiert. Die DIG-markierte DNA-Sonde wird für 10 Minuten bei 95°C denaturiert, danach sofort auf Eis abgekühlt und zum vorgewärmten DIG-Easy Hyb gegeben (3,5µl Sonde/10ml DIG\_easy Hyb). Die Membran wird dann über Nacht unter leichtem Schütteln bei 50°C mit einer Sonde inkubiert. Nach der Hybridisierung wird die Sonde von der Membran abgenommen und kann bei -20°C gelagert werden. Die Membran wird zweimal 10 Minuten mit 2x SSC/ 0,1% SDS-Lösung bei RT gewaschen und anschließend zweimal 15 Minuten mit 0,1% SSC/ 0,1% SDS-Lösung bei 68°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

#### **3.3.4.7 Waschen, Blockierung und Entwicklung**

Nach der Hybridisierung wird die Membran 5 Minuten bei RT in Waschpuffer geschwenkt. Nach 30 Minuten Inkubation mit Blockierungslösung wird die Membran für 30 Minuten mit der Antikörper-Lösung (Anti-DIG-Antikörper, 1:5000 in Blockierungslösung) inkubiert. Vor der Entwicklung wird die Membran zweimal 15 Minuten mit Waschpuffer, dann 5 Minuten mit Detektionspuffer und schließlich 5 Minuten mit der Substratlösung (CDP-Star ready-to-use, Roche) inkubiert. Das Substrat wird von der alkalischen Phosphatase, welche an den anti-DIG-Antikörper gebunden ist, zu einem Produkt umgesetzt, welches Lichtsignale emittiert, die dann mit einem Röntgenfilm detektiert werden können (Expositionszeiten: 30 Sekunden bis 10 Minuten).

### **3.3.5 Bradford-Test**

Zur Bestimmung der Konzentration einer Proteinlösung wird die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Diese beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue an Proteine. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe. Ohne Proteinbindung liegt das Maximum bei 465nm, bei Bindung an das Protein beträgt das Absorptionsmaximum 595nm. Die Zunahme der Absorption bei 595nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zunächst wird eine Eichreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen in PBS hergestellt und mit Färbelösung (BioRad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat) versetzt. Ebenso werden Verdünnungen der Proteinlösung hergestellt. Die Proben werden bei 595nm im Photometer vermessen. Anhand der durch die Eichreihe ermittelten Eichgerade kann die Konzentration der Proben bestimmt werden.

## **3.4 Tierische Zellkultur**

### **3.4.1 Lösungen und Medien**

<b>DMEM:</b>	13,63g/l DMEM-Pulver; 3,67g/l (44mM) NaHCO <sub>3</sub> ; 2,6g/l (10mM) HEPES; pH 7.2
<b>huMSC-Medium:</b>	432,5 ml Dulbecco's MEM (1x; 3,7g/l NaHCO <sub>3</sub> , 1g/l D-Glucose; FG0415, Biochrom); 50ml (10%) FCS; 5ml (1%) Pen/Strep-Lsg.; 12,5ml (2,5%) HEPES-Puffer; 2ng/ml FGF-2 (#100-18B; tebu-bio)

<b>Pen/Strep-Lsg. (100fach):</b>	6,6g/l Ampicillin; 10g/l Streptomycin
<b>Pen/Strep-Lsg. (huMSC):</b>	100U/ml Penicillin; 100µg/ml Streptomycin (A2213; Biochrom)
<b>Glutamin-Lsg. (100fach):</b>	29,22g/l (200mM) Glutamin
<b>HEPES-Puffer (huMSC):</b>	1M HEPES (L1613; Biochrom)
<b>PBS:</b>	8g/l (140mM) NaCl; 0,2g/l (27mM) KCl; 1,15g/l (7,2mM) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O; 0,2g/l (14,7mM) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>TEP:</b>	10ml Trypsin-Lsg. (5g/l Trypsin; 2g/l EDTA in 1x PBS); 90ml PBS
<b>TEP (huMSC):</b>	10 ml Trypsin-Lsg (5g/l Trypsin; 2g/l EDTA in 10x PBS) in 90ml H <sub>2</sub> O
<b>Puromycin-Lsg.:</b>	2,5mg/ml Puromycin
<b>G418-Lsg.:</b>	100mg/ml Geneticin® (G-418 Sulfat)
<b>FCS:</b>	Das FCS (Biowest oder JRH) wird vor dem Gebrauch für 45 Minuten bei 56°C inkubiert, um Komplementfaktoren zu deaktivieren.
<b>DMEM<sup>++</sup>/10% FCS:</b>	88% (v/v) DMEM; 1% (v/v) Pen/Strep-Lsg. (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lsg. (100fach); 10% (v/v) FCS
<b>DMEM<sup>++</sup>/10% FCS/ Puro:</b>	5µg/ml Puromycin-Lsg. (2,5mg/ml) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>DMEM<sup>++</sup>/10% FCS/ G418:</b>	0,75mg/ml G418-Lsg. (100mg/ml) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>DMEM<sup>++</sup>/10% FCS/ Puro/ G418:</b>	5µg/ml Puromycin-Lsg. (2,5mg/ml); 0,75mg/ml G418-Lsg. (100mg/ml) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>MEM<sup>++</sup>/10% FCS:</b>	MEM, 1% Glutamin (100 fach); 1% Pen/Strp-Lösung (100fach), 10 % (v/v) FCS
<b>MEM<sup>++</sup>/5% FCS:</b>	MEM, 1% Glutamin (100 fach); 1% Pen/Strp-Lösung (100fach), 5 % (v/v) FCS

Für die Kinetik der Zelldifferenzierung wird ein modifiziertes Medium eingesetzt. Dieses enthält das für die Differenzierung wichtige Natriumascorbat (Stock-Lösung 50µg/ml) und β-Glycerolphosphat (Stock-Lösung 10mM). Natriumascorbat stimuliert die Kollagensynthese (Jeffrey und Martin, 1966), β-Glycerolphosphat fördert als zusätzliche organische Phosphatquelle die Mineralisierung (Owen et al., 1990) und erhöht die Alkalische Phosphatase-Aktivität in osteoblastoiden Zellen (Quarles et al., 1992).

<b>DMEM<sup>++D</sup>/10% FCS:</b>	1% (v/v) Natriumascorbat (50µg/ml); 1% (v/v) β-Glycerolphosphat (10mM) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>DMEM<sup>++D</sup>/10% FCS/ Puro:</b>	5µg/ml Puromycin-Lsg. (2,5mg/ml); 1% (v/v) Natriumascorbat (50µg/ml); 1% (v/v) β-Glycerolphosphat (10mM) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>DMEM<sup>++D</sup>/10% FCS/ G418:</b>	0,75mg/ml G418-Lsg. (100mg/ml); 1% (v/v) Natriumascorbat (50µg/ml); 1% (v/v) β-Glycerolphosphat (10mM) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>DMEM<sup>++D</sup>/10% FCS/ Puro/ G418:</b>	5µg/ml Puromycin-Lsg. (2,5mg/ml); 0,75mg/ml G418-Lsg. (100mg/ml); 1% (v/v) Natriumascorbat (50µg/ml); 1% (v/v) β-Glycerolphosphat (10mM) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>huMSC-Medium<sup>D</sup>:</b>	1% (v/v) Natriumascorbat (50µg/ml); 1% (v/v) β-Glycerolphosphat (10mM) in huMSC-Medium

Die Medien werden bei 4°C gelagert, die Lösungen und das FCS bei -20°C.

### 3.4.2 Zelllinien

<b>C3H10T<sup>1/2</sup>:</b>	diploide Fibroblasten-Zelllinie, aus einem C3H-Mausembryo isoliert (Reznikoff, C. A. et al., 1973a, b), ATCC, Kat. Nr.: CCL226
<b>C3H10T<sup>1/2</sup> BMP2/T7T3:</b>	C3H10T <sup>1/2</sup> -Zelllinie, rekombinant BMP2 exprimierend, Puromycin- und G418-resistent
<b>C3H10T<sup>1/2</sup> BMP2/Smad8 L+MH2:</b>	C3H10T <sup>1/2</sup> -Zelllinie, rekombinant BMP2 und konstitutiv aktives Smad 8 exprimierend, Puromycin- und G418-resistent (Hoffmann, A. et al., 2006)
<b>HEK293T-Zellen:</b>	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit gescherter Adenovirus Serotyp 5 DNA, E1-exprimierend (Graham, FL., 2002); zusätzliche Expression vom großen SV40 T-Antigen (293tsA1609neo, ATCC, Kat. Nr.: CRL-11268)
<b>HEK 293-Zellen Low passage:</b>	Human Embryonic Kidney 293, ATCC, Kat. Nr. PD-02-01, besonders gut geeignet für Arbeit mit Adenovirus
<b>A549-Zellen:</b>	Lung carcinoma, human, ATCC Kat. Nr. CCL-185
<b>huMSC:</b>	humane mesenchymale Stammzellen; zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Thomas Häupl aus der Charité in Berlin

### 3.4.3 Kulturbedingungen

Die Zellen werden in Kulturflaschen, Petrischalen oder Mehrlochplatten mit Wachstumsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator inkubiert. Das Medium wird alle zwei bis drei Tage gewechselt.

<b>C3H10T<sup>1/2</sup> + cDNA:</b>	DMEM <sup>++</sup> /G418
<b>C3H10T<sup>1/2</sup> /BMP2:</b>	DMEM <sup>++</sup> /Puromycin
<b>C3H10T<sup>1/2</sup> /BMP2 + cDNA :</b>	DMEM <sup>++</sup> /Puromycin/G418
<b>C3H10T<sup>1/2</sup> (AV) :</b>	MEM <sup>++</sup>
<b>C3H10T<sup>1/2</sup> / BMP2 + DNA (AV) :</b>	MEM <sup>++</sup> /Puromycin
<b>HEK 293:</b>	DMEM <sup>++</sup>
<b>HEK 293 low passage:</b>	MEM <sup>++</sup>
<b>A549:</b>	DMEM <sup>++</sup>
<b>huMSC:</b>	huMSC-Medium

### 3.4.4 Beschichtung mit Poly-D-Lysin (PDL)

Durch Beschichtung der Flaschen mit PDL wird ein besseres Haften der Zellen auf dem Flaschenboden gewährleistet. Dies ist beispielsweise bei Immunfluoreszenz von Bedeutung. Das Poly-D-Lysin wird 1:10 mit autoklaviertem Wasser auf eine Konzentration von 0,1mg/ml verdünnt. Pro kleine Flasche werden 1,5ml von dieser Suspension auf dem Boden verteilt, dabei muss darauf geachtet werden, dass der komplette Flaschenboden benetzt ist. Nach 10 minütiger Inkubation wird das PDL entfernt und dreimal mit mindestens 2ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend können die Zellen direkt ausgesät werden oder die Flaschen werden unter der Sterilbank getrocknet.

### 3.4.5 Auftauen von Zellen

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen werden zunächst für 1 bis 2 Stunden bei -70°C gelagert. Danach werden die Zellen so schnell wie möglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine kleine Kulturflasche mit 7ml Medium überführt. Nach Inkubation von 4 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel mit 5ml frischem Medium zur Entfernung des DMSO, das in der Einfrierlösung enthalten war.

### 3.4.6 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen werden diese zunächst mit warmen PBS gewaschen und danach trypsiniert (siehe 3.4.7). Die Zellsuspension wird bei 4°C und 320 x g 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Das Zellpellet wird in eiskalter Einfrierlösung (95% FCS und 5% DMSO) resuspendiert und auf Kryo-Röhrchen aufgeteilt. Diese werden für 24 Stunden bei -70°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Um das Anwachsen und die Vitalität der Zellen zu überprüfen, wird direkt nach dem Einfrieren eine Taukontrolle durchgeführt (3.4.5).

### 3.4.7 Passagieren von Zellen

Die Zellen werden zunächst mit warmem PBS gewaschen und mit TEP überschichtet. Bei den HEK293-Zellen wird das TEP nach kurzem Schwenken über dem Zellrasen sofort wieder entfernt. Bei allen anderen verwendeten Zelllinien werden die Zellen mit dem TEP für wenige Minuten inkubiert. Durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche löst sich der Zellenrasen vom Boden des Kulturgefäßes ab. Die Zellsuspension wird zur Deaktivierung des Trypsins mit mindestens der doppelten Menge Medium versetzt und resuspendiert. Die Zellzahl der Zellsuspension kann mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Faktor 5000) bestimmt werden. Dazu werden die HEK293-Zellen 1:10 verdünnt eingesetzt und die anderen verwendeten Zelllinien werden unverdünnt gezählt. Die Zellsuspension kann anschließend nach Verdünnung mit der gewünschten Menge an Medium auf neue Kulturgefäße verteilt werden.

### 3.4.8 Fixieren von Zellen mit Paraformaldehyd

Die Zellen einer kleinen Flasche werden nach Absaugen des Mediums mit 5ml PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 5ml 3%igem Paraformaldehyd in PBS (PFA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS von jeweils 5 Minuten werden diese schließlich in 7ml PBS bei 4°C bis zu den histologischen Färbungen gelagert.

### 3.4.9 Stabile Transfektion von DNA

Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen mit dem Ziel einer stabilen Integration dieser DNA in das Wirtsgenom kann man sich einer Vielzahl unterschiedlicher Transfektionssysteme bedienen. Bei der hier gewählten Methode der Co-Transfektion wird das Ziel-Gen mit einem Selektionsplasmid für Antibiotikaresistenz im Konzentrationsverhältnis 1:10 zusammen eingesetzt. Das Selektionsplasmid wird ebenfalls in das Wirtsgenom integriert und ermöglicht den Zellen, in Medium mit Antibiotikum zu wachsen, während die nicht mit dem Selektionsplasmid transfizierten Zellen absterben, auch wenn sie das Ziel-Gen aufgenommen haben. Da die Möglichkeit besteht, dass das Selektionsplasmid auch ohne Ziel-Gen in die Zellen transfiziert, müssen nach Transfektion und Selektion die sich bildenden Zellkolonien einzeln isoliert und anschließend genetisch untersucht werden.

### 3.4.10 Kinetik der Zelldifferenzierung

Um die Auswirkung eines transfizierten Gens in Zellen bezüglich des Differenzierungsverhaltens nach Erreichen der Konfluenz beurteilen zu können, werden an definierten Tagen

vor und nach Erreichen der Konfluenz RNA und Proteine isoliert und Zellen mit PFA fixiert, um diese später histologisch anfärben zu können. Für jeden gewünschten Zeitpunkt der Kinetik muss somit eine kleine Flasche mit Zellen zur RNA-Isolierung und zur Fixierung mit PFA zur Verfügung stehen. Die Proteinexpression wird nur zu einem Zeitpunkt nach Erreichen der Konfluenz untersucht. Je nach Anzahl der Untersuchungszeitpunkte werden die Zellen in eine entsprechende Anzahl von kleinen Flaschen ausgesät (5000c/cm<sup>2</sup>). An den zuvor festgelegten Zeitpunkten werden dann Flaschen zur Protein-Isolierung, RNA-Isolierung und PFA-Fixierung verwendet.

### 3.4.11 Dokumentation der Morphologie

Die Dokumentation der Morphologie der Zellen während der Kinetik zur Zelldifferenzierung erfolgt mit Hilfe des Leitz Labovort FS Lichtmikroskops mit angeschlossener Intas 3-Chip-Farb-Video-Kamera über die Programme MV acquire control configuration und Adobe Photoshop 7.0.

### 3.4.12 Histologische Färbungen

Die mit Paraformaldehyd fixierten Zellen können durch verschiedene histologische Färbungen auf ihre Differenzierungsrichtung untersucht werden. Als ein Osteoblasten-typischer Marker wird Alkalische Phosphatase verwendet. Hypertrophe Chondrozyten, spezifisch das in Knorpel vorkommende saure, sulfatreiche Proteoglykan, kann durch Alcian Blau angefärbt werden.

<b>NBT/BCIB:</b>	SigmaFast™ Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate Ready-to-use Tablette in 10 ml dH <sub>2</sub> O (Sigma)
<b>Alcian Blau:</b>	0,5% (w/v) Alcian Blue 8G (Sigma) in 0,1 M HCl, filtriert

#### 3.4.12.1 Alkalische Phosphatase Färbung

Die fixierten Zellen werden mit NBT/BCIP bis zu 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bis eine deutliche Violett-Färbung der Zellen sichtbar wird. Danach wird die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Anschließend können die Zellen eingedeckelt werden.

#### 3.4.12.2 Eindeckeln der gefärbten Zellen

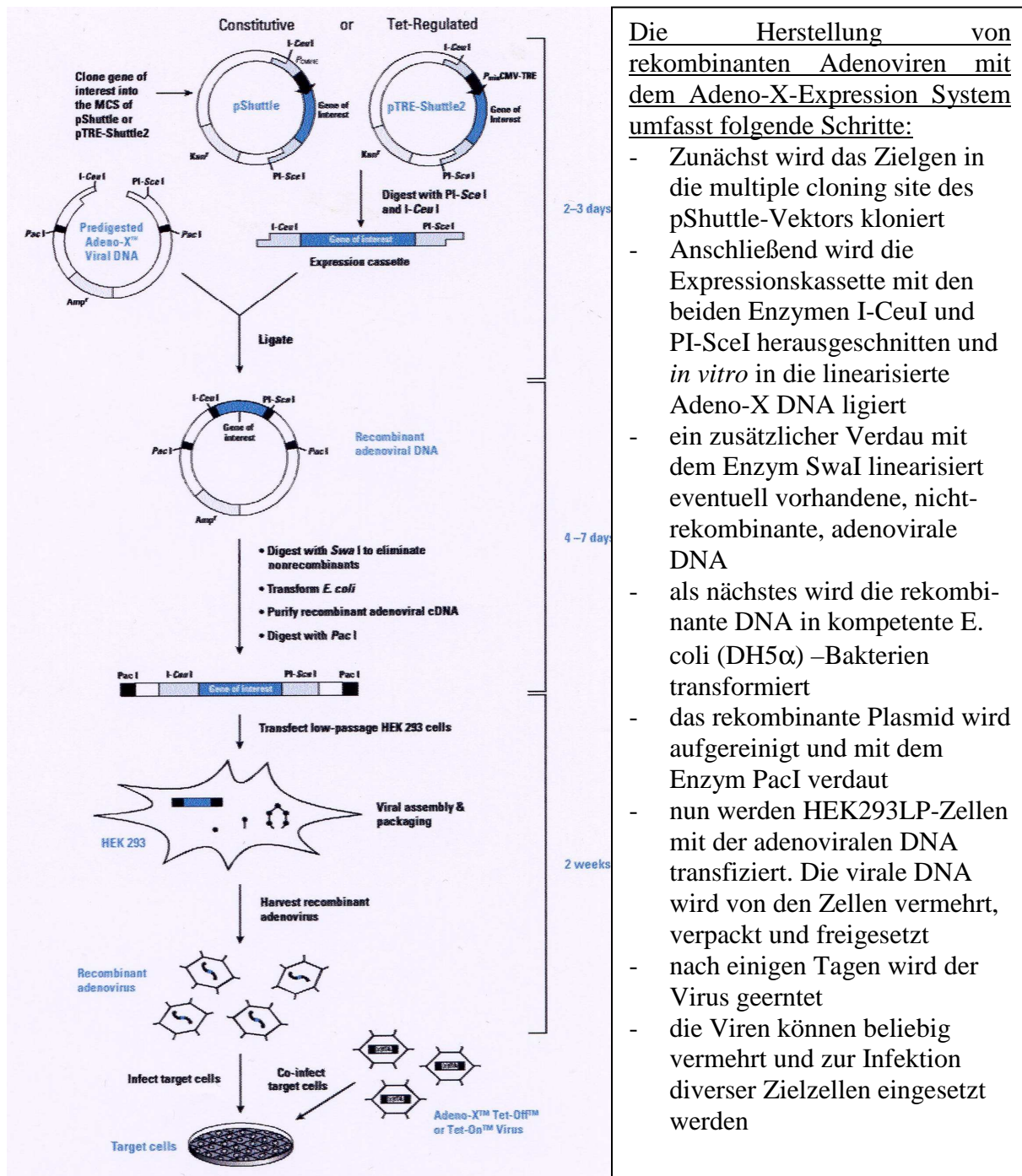
Die Zellen werden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt. Dazu wird die Gelatine im Wasserbad bei 60°C verflüssigt. Davon werden ungefähr 200µl auf die gefärbten Zellen getropft und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt.

#### 3.4.12.3 Dokumentation der gefärbten Zellen

Die Dokumentation der gefärbten und eingedeckelten Zellen erfolgt mit dem Zeiss Axioplan Mikroskop und der Sony-MPEG Movie Ex Digitalkamera. Die Bilder werden mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

### 3.5 Adenoviren

#### 3.5.1 Übersicht über die Herstellung von Adenovirus mit dem Adeno-X™ Adenoviral Expression System



**Abbildung 20:** Übersicht über die Herstellung von Adenovirus.

Mit der Expressionskassette aus pShuttle wird das Zielgen in den Adeno-X-Vektor kloniert. Ein PacI-Verdau linearisiert die virale DNA, bevor sie in HEK LP-Zellen transfiziert, vermehrt, verpackt und als rekombinanter Adenovirus freigesetzt werden kann. Der rekombinante Adenovirus kann anschließend beliebig vermehrt, aufgereinigt und zur Infektion von Zielzellen eingesetzt werden (aus dem Handbuch des Adeno-X™ Expressionsystems von der Firma Clontech)

Die Adenoviren gehören zu der Familie der nicht-behüllten DNA-Viren mit den Gattungen Mastadenovirus (Adenoviren von Säugetieren) und Aviadenovirus (Adenoviren von Vögeln).



Adenoviren wurden erstmals 1953 aus Tonsillen und adenoidem Gewebe von Kindern isoliert. Inzwischen sind von den humanen Adenoviren 47 Serotypen bekannt. Adenoviren haben ein sehr breites Wirtsspektrum. Sie können sich teilende, ruhende wie auch bereits ausdifferenzierte Zellen infizieren. Sie verursachen akute Infektionen der Atemwege, der Augen und des Magen-Darm-Trakts; die meisten Infektionen verlaufen jedoch subklinisch. Die genauen Kenntnisse über Adenoviren haben dazu geführt, dass sie heutzutage als Vektoren für die Gentherapie genutzt werden. Die in der Genregulation- und Genexpressionsforschung am häufigsten eingesetzten Adenoviren sind humane Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5) und vom Serotyp 2 (Ad2). Die in dieser Arbeit zum Einsatz kommende Adeno-X-virale DNA ist eine Ad 5 E1/E3-Deletionsmutante, die die Zielzellen zwar infizieren, sich darin aber nicht replizieren kann (Mizuguchi und Kay, 1998). Mit der Deletion der E1- und E3-Region verliert der Virus die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung sowie zur Modulation des Zellzyklus und der zellulären Immunantwort. Die restlichen Gene verbleiben in funktionaler Anordnung.

#### **3.5.1.1 Klonierung von Zielgenen in pShuttle**

Zur Klonierung von Zielgenen in den pShuttle-Vektor wurden die im Kapitel 3.1 zusammengefassten Methoden verwendet.

#### **3.5.1.2 Klonierung der Expressionskassette in Adeno-X DNA**

Für den PI-SceI/I-Ceu-Verdau werden 2µl pShuttle-Plasmid-DNA (0,5g/l), 3µl 10x BSA, 3µl 10x-Double Digestion buffer, 2µl PI-SceI (1 U/µl) und 0,5µl I-CeuI mit 19,5µl H<sub>2</sub>O versetzt. Der Reaktionsansatz wird für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden zur Fällung der DNA 70µl TE, pH 8.0 und 100µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 hinzugefügt, alles gründlich gevortext und für 5 Minuten bei 20.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Die Oberphase wird in ein neues Gefäß überführt und mit 400µl 95% EtOH, 25µl 10M Natriumacetat und 1µl Glycogen versetzt (20mg/ml). Nach erneutem vortexen und zentrifugieren wird der Überstand entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Zum Schluss wird das Pellet in 10µl TE, pH 8.0 gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Ligation in den Adeno-X-Vektor findet weitgehend entsprechend der im Kapitel 3.1.8 beschriebenen Vorgehensweise statt. Zu beachten sind lediglich das Verhältnis von PI-SceI/I-CeuI-verdauter pShuttle-Plasmid-DNA (siehe oben, 2µl) zum vorverdauten Adeno-X-Vektor (250ng/µl, 3µl) und eine Temperatur von 16°C. Phenolisierung und Fällung der DNA erfolgen nach den oben erwähnten Schritten, das Pellet wird in 15µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Die ligierte DNA wird einem SmaI-Verdau unterzogen, um nicht-rekombinante Adeno-X-Vektoren zu linearisieren und somit die Anzahl an nicht-rekombinanten Klonen zu verringern. Phenolisierung und Fällung der DNA erfolgen nach den oben erwähnten Schritten, das Pellet wird in 10µl TE, pH 8.0 gelöst.

#### **3.5.1.3 Verdau von adenoviraler DNA mit dem Enzym PacI**

Für den PacI-Verdau werden 20µg DNA eingesetzt. Diese werden mit 16µl NEB1+DTT (1:100), 16µl BSA (1g/l), 1µl PacI Restriktionsenzym (1U/µl). Dieser Ansatz wird mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 160µl aufgefüllt und anschließend für 2 Stunden bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Phenolisierung und Fällung der DNA erfolgen nach den oben erwähnten Schritten, das Pellet wird in 10µl TE, pH 8.0 gelöst.

#### **3.5.1.4 Transfektion von HEK293 LP-Zellen mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung**

Pro DNA-Konstrukt wird eine 75cm<sup>2</sup> große Flasche benötigt, die zu 80-90% konfluent mit HEK293 LP-Zellen bewachsen ist. Um die Transfektion erfolgreich durchzuführen, ist ein Mediumwechsel mit DMEM<sup>++</sup>/10% FCS 4 Stunden vor Beginn der Transfektion sinnvoll, da

die Zellen durch den höheren Phosphatgehalt in diesem Medium kompetenter gemacht werden und sie somit die DNA besser aufnehmen können.

**2x HEBS-Puffer:** 5 g/l HEPES; 8 g/l NaCl; 0,37 g/l KCl; 0,125 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 1 g/l Glucose; pH 7.1

Herstellung der Transfektionslösung: 1250µl 2x HEBS-Puffer werden in ein steriles Polystyrol-Röhrchen vorgelegt. In ein weiteres Polystyrol-Röhrchen werden 2x 560µl Wasser gegeben, mit 125µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> versetzt und ordentlich gevortext. Anschließend werden die 20µl DNA-Lösung (1µg/µl) hinzutropft und vorsichtig gemischt. Der HEBS-Puffer wird auf dem Vortexer stabil geschüttelt und die DNA/CaCl<sub>2</sub>-Lösung tropfenweise direkt auf die Oberfläche des HEBS-Puffers aufgetragen (Vorgang sollte ungefähr 3 bis 5 Minuten dauern). Die Lösung ist daraufhin leicht gräulich. Bei genauem Hinsehen sind die kleinen Präzipitate als Schwebeteilchen zu erkennen. Das Präzipitat wird für 1 Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird die Transfektionslösung mit einer Pipette mehrmals kräftig aufgemischt und schließlich dem Medium auf den Zellen hinzugefügt. Die Suspension wird kräftig durchmischt, bevor die Zellen erneut in den Brutschrank zwischengelagert werden.

Nach 16stündiger Inkubation erfolgt ein Mediumwechsel mit MEM<sup>++</sup>/5% FCS. Bis zur massiven Bildung von Plaques wird das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

#### **3.5.1.5 Ernte von Virusflaschen (FTL)**

Die Ernte der Virusflaschen erfolgt in 50 ml Greiner-Röhrchen. Zunächst wird die Flasche kräftig geschlagen, damit sich möglichst der gesamte Zellrasen von selbst ablöst. Mit Hilfe eines Zellschabers können Zellreste abgekratzt werden. Die Zellsuspension wird mit einer gestopften Pipette in ein 50ml Greiner-Röhrchen überführt und für 8 Minuten, bei 300 g und 4°C abzentrifugiert. Der Mediumüberstand wird in ein 15ml Greiner-Röhrchen überführt und eingefroren, der restliche Überstand wird verworfen. Durch Zugabe von 5ml PBS<sup>++</sup> (+Mg<sup>2+</sup>, +Ca<sup>2+</sup>) werden die Viren stabilisiert. Das Röhrchen wird für 30 Minuten bei -70°C eingefroren, anschließend im Wasserbad aufgetaut und aufgeschüttelt. Diese Prozedur erhöht den Aufschluss der Zellen und somit die Freisetzung der Viren. Der Vorgang des Einfrierens und Auftauens wird zweimal wiederholt. Nach dem dritten Auftauen wird das FTL (first transfection lysate) bei -20°C gelagert. Es dient zur Herstellung von größeren Mengen an Virus und zur Reserve.

### **3.5.2 Vermehrung und Analyse von Adenoviren**

#### **3.5.2.1 Prä-Infektion 1. Grades**

Die 5ml FTL werden aufgetaut und aufgeschüttelt. Nach Zentrifugation bei 800 x g und 4°C für 10 Minuten, werden von der Virussuspension 1ml abgenommen und zu 4ml 1x PBS/2% FCS, welches steril filtriert ist, gegeben, was einer 1:5 Verdünnung entspricht. Das restliche FTL wird wieder bei -20°C eingefroren. Dieser Virus/PBS-Mix wird auf eine große Roux-Flasche gegeben, welche konfluent mit HEK293 LP-Zellen ist. Nach 1 bis 2 Stunden Inkubation des Virus-Gemisches bei 5 rpm auf einen Schüttler werden 45 ml MEM<sup>++</sup>/5% FCS-Medium hinzugegeben und die Flasche im Virusbrutschrank inkubiert.

Die Ernte der Prä-Infektion ähnelt der der FTL-Ernte (siehe Kapitel 3.5.1.5). Das Pellet wird jedoch in insgesamt 20 ml PBS<sup>++</sup> aufgenommen.

### 3.5.2.2 Prä-Infektion 2. Grades

Zur Herstellung der Prä-Infektion 2. Grades wird die Prä-Infektion 1. Grades aufgetaut und für 10 Minuten bei 800 x g und 4°C abzentrifugiert. Von dieser Virussuspension wird 1 ml zu 24 ml 1x PBS/ 2% FCS gegeben. Davon werden 8ml auf je 1 gelbe Roux-Flasche (konfluent mit HEK293 LP-Zellen) gegeben und für 1 bis 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Pro DNA-Konstrukt werden drei gelbe Flaschen infiziert. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 65ml MEM<sup>++</sup>/ 5% FCS. Die Flaschen werden im Virusbrutschrank inkubiert.

Die Ernte der Prä-Infektion ähnelt der FTL-Ernte (siehe Kapitel 3.5.1.5). Das Pellet wird jedoch in insgesamt 30ml PBS<sup>++</sup> aufgenommen.

### 3.5.2.3 DNA-Isolierung

Zur DNA-Untersuchung werden HEK293 LP-Zellen benötigt, die in einer 6-well-Platte zu 80% dicht vorliegen. Es werden nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden Proben entnommen und davon DNA-Analysen durchgeführt.

<b>Pronase-Puffer:</b>	10 mM Tris, pH 7.5; 10 mM EDTA; 0,5% SDS
<b>Pronase-Enzym:</b>	5 mg/ml Pronase in 10 mM Tris, pH 7.5
<b>Pronase-Arbeitslösung:</b>	Pronase-Enzym 1:10 in Pronase-Puffer verdünnen

Zuerst wird eine 1:10 Virusverdünnung aus Prä-Infektion mit 1x PBS/ 2% FCS hergestellt (500µl Virus zu 4,5ml 1x PBS/ 2% FCS). Von dieser Mischung wird 1ml auf jedes well gegeben und für 1 bis 2 Stunden bei 5 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von 4ml MEM<sup>++</sup>/ 5% FCS werden die Zellen bis zur ersten Probenentnahme im Virusbrutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden wird das Medium vom ersten well abgenommen und für 10 Minuten bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in 1ml Pronase-Arbeitslösung (900µl Pronase-Puffer zu 100µl Pronase-Enzym) resuspendiert und über Nacht auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wird das Lysat in ein 15ml Greiner-Röhrchen überführt, das 'leere' well mit 1ml TE (10/1) nachgespült und dem Lysat hinzugefügt. Nach Zugabe von 2ml Phenol wird die DNA-Lösung vorsichtig gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die gleiche Prozedur erfolgt mit der 48 Stunden- und 72 Stunden-Probe.

Zur Weiterverarbeitung der DNA-Proben werden diese für 1 Stunde bei 5 rpm leicht geschüttelt. Danach werden 2ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und für 15 bis 30 Minuten wie zuvor geschüttelt. Die Zentrifugation erfolgt für 10 Minuten bei 2000 x g und 20°C. Die Überstände werden abgenommen und gesichert, die Unter- und Interphasen werden verworfen. Die eben erwähnten Schritte werden ein zweites Mal durchgeführt. Beim dritten Mal werden 2ml Chloroform hinzugefügt, die restlichen Schritte bleiben aber gleich. Nach erneutem Sichern der Oberphasen wird das 2,5fache Volumen absolutes Ethanol (-20°C) zur Präzipitation der DNA langsam hinzupipettiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 3200 x g werden die Überstände verworfen und das Pellet mit 2ml 70% EtOH (-20°C kalt) gewaschen. Es erfolgt erneut eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 3500 x g. Das Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend über Nacht in 200µl TE gelöst.

### 3.5.2.4 Protein-Isolierung

Zur Protein-Analyse werden A549-Zellen benötigt, die zu 80% konfluent in einer 6-well-Platte vorliegen. Es werden nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden Proben entnommen und davon Protein-Analysen durchgeführt.

**Lysis-Puffer:** 20 mM Tris, pH 7.5; 140 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2% SDS  
**Benzonase-Enzym:** Benzon Nuclease, 10.000 U/ml

Zuerst wird eine 1:10 Virusverdünnung aus Prä-Infektion mit 1x PBS/ 2% FCS hergestellt (500µl Virus zu 4,5ml 1x PBS / 2% FCS). Von dieser Mischung wird 1ml auf jedes well gegeben und für 1 bis 2 Stunden bei 5 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von 4ml MEM<sup>++</sup>/ 5% FCS werden die Zellen bis zur ersten Probenentnahme im Virusbrutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden wird das Medium vom ersten well abgenommen und für 10 Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in 200µl Lysispuffer plus Benzonase (1:200) resuspendiert, auf die Zellen pipettiert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wird das Proteinlysate in ein Eppendorfgefäß überführt. Das 'leere' well wird mit 100µl TE (10/0,1) bei 37°C kurz inkubiert und anschließend dem Proteinlysate hinzugefügt. Ebenso werden die 48- und 72 Stunden-Proben behandelt.

Zum Nachweis der Proteine wird eine SDS-Page (siehe 3.5.3) durchgeführt, wobei die Proben mit Laemmi-Probenpuffer versetzt werden.

### 3.5.3 Großproduktion und Aufreinigung von Adenovirus

#### 3.5.3.1 Infektion von HEK293 LP-Zellen mit Adenovirus

Für die Großproduktion von Adenovirus werden 20 gelbe Roux-Flaschen mit HEK293 LP-Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz hochgezogen. Die Prä-Infektion 2. Grades (siehe 3.5.2.2) wird aufgetaut und bei 800 x g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Zu 15ml Virus werden 85ml PBS/ 2% FCS gegeben. Von den HEK293 LP-Zellen wird das Medium entfernt und die Zellen mit 20ml der Virussuspension bedeckt. Die Lösung soll auf den Zellen für 1 bis 2 Stunden bei maximal 5 rpm auf dem Schüttler inkubieren. Nach Ablauf der Zeit wird der Virussuspension 60ml MEM<sup>++</sup>/ 5% FCS zugefügt. Die Zellen werden bis zur Lyse im Brutschrank inkubiert.

#### 3.5.3.2 Ernte der infizierten HEK293 LP-Zellen

Die Zellernte erfolgt meist nach 2 bis 3 Tagen, wenn ein deutlicher zytotoxischer Effekt sichtbar ist. Der restliche Zellrasen wird durch abklopfen oder schaben gelöst und die so entstandene Zellsuspension auf acht 50ml Greiner-Röhrchen verteilt und für 10 Minuten bei 200 x g und 4°C abzentrifugiert. Anschließend werden die Überstände abdekantiert. Da in den 20 gelben Flaschen ein Gesamtvolumen von 1600ml vorliegt, die acht 50ml Greiner-Röhrchen aber nur 400ml fassen, muss dieser Vorgang noch dreimal wiederholt werden. Vom dekantierten Gesamtüberstand wird eine Probe zur späteren Kontrolle bei -70°C aufbewahrt.

Zu den Zellpellets werden jeweils 5ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8.0 hinzugegeben, sie werden resuspendiert und in ein neues Greiner-Röhrchen überführt (ml-Anzahl notieren!), wobei je vier Pellets in einem 50ml Falcon vereinigt werden. Anschließend werden diese 4 Röhrchen nochmals mit 1x 5ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8.0 gespült. Die Zellen werden durch diesen 1. Waschschriff von acht auf zwei Pellets eingengt. Es folgt eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 200 x g und 4°C.

Die beiden Pellets werden durch zweimaliges Waschen (2. und 3. Waschschriff) mit jeweils 30ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8.0 und erneuter Zentrifugation gereinigt und gesammelt. Nach dem 3. Waschschriff werden die Überstände möglichst gründlich entfernt und die beiden Zellpellets soweit mit 0,1M Tris-HCl, pH 8.0 überschichtet, so dass in jedem Falcon ein Gesamtvolumen von 2,5ml Virussuspension vorliegt (d.h. 2,5ml abzüglich der oben ermittelten Pelletvolumina). Durch leichtes Schütteln wird die Suspension gemischt und anschließend bei -20°C gelagert.

### 3.5.3.3 CsCl-Gradient und Ultrazentrifugation

<b>Gesättigte CsCl-Lösung:</b>	CsCl zu 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA
<b>Benzonase (Benzon Nuclease):</b>	10.000 U/ml
<b>Sodium Desoxycholat:</b>	5 g Na-desoxycholat in 100 ml H <sub>2</sub> O

Die bei der Großproduktion des Virus gewonnenen Zellpellets (siehe 3.5.3.1) werden aufgetaut, mit 1/10 Volumen (250µl) 5% Sodium Desoxycholat versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 2µl Benzonase pro Pellet soll die Lösung viskos werden. Diese Reaktion dauert 30 bis 45 Minuten. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation der Suspensionen für 10 Minuten bei 1250 x g. Der Überstand wird vorsichtig in ein 15ml Greiner-Röhrchen überführt. Das entstandene Pellet wird solange bei -20°C aufbewahrt, bis die DNA- und Proteinkontrollen (siehe Kapitel 3.5.2.3 und 3.5.2.4) des isolierten Virus abgeschlossen sind. Der Überstand wird exakt auf 3,1ml mit 0,1M Tris-HCl, pH 8.0 aufgefüllt. Dieses Volumen muss eingehalten werden, da das Zentrifugenröhrchen, in das die Suspension später eingefüllt wird, genau bis zur Markierung gefüllt werden muss. Als nächstes erfolgt die Zugabe von 1,8ml CsCl-Lösung zu der Virussuspension. Dieses Gemisch wird mit Hilfe einer Pasteurpipette, die als Trichter dient, in ein Quick-Seal-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Kapazität 5,1ml, 13 x 51mm) überführt. Dabei werden die 4,9ml Virussuspension mit 300µl 0,1 M Tris-HCl, pH 8.0/CsCl-Lösung (Verhältnis 31:18) versetzt und so lange in das Röhrchen getropft, bis der Meniskus 1mm hoch im Hals steht. Das Röhrchen wird im "Quickseal-Apparat" zugeschweißt und auf Dichtheit überprüft. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge TL100 im Rotor TLA 110 bei 120000 x g für 24 Stunden. Nach der Zentrifugation sollte die DNA etwa in der Mitte des Röhrchens (Schwebedichte ca. 1,7g/cm<sup>3</sup>) als graue Bande sichtbar sein.

Zapfen der DNA-Bande: Das Röhrchen wird in einer Stativklammer befestigt und zum Druckausgleich mit einer kleinen Kanüle (G 23) oben angestochen. Etwa 2cm unterhalb der Bande wird das Röhrchen mit einer zweiten Kanüle (G 20) unter leichter Drehbewegung angestochen. Dabei die Kanülenöffnung direkt unterhalb der Bande positionieren und die DNA langsam in einem möglichst geringen Volumen in ein Eppendorfgefäß tropfen lassen.

Die gezapften DNA-Banden ein und desselben Virus (2 Pellets aus einer Großproduktion entsprechen 2 CsCl-Gradienten) werden vereint, mit 0,1M Tris-HCl, pH 8.0/ CsCl-Lösung (Verhältnis 31:18) auf 4,9 ml aufgefüllt und ein zweites Mal einer CsCl-Gradienten-Zentrifugation unterzogen (gleiche Durchführung wie zuvor).

Der abgezapfte Virus wird in ein Kryotube überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert.

## 3.5.4 Titration des Virus

### 3.5.4.1 Virusvorverdünnung

In zwei 24-well-Platten pro Virus werden in der ersten Spalte 990µl PBS/ 2% FCS vorgelegt, in die restlichen Löcher jeweils 900µl. Insgesamt werden Virusverdünnungen von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-13</sup> hergestellt.

Von dem aufgereinigten Virus wird eine 1:10 Verdünnung in PBS/ 2% FCS (5µl Virus plus 45µl PBS/ 2% FCS) hergestellt und vorsichtig gevortext. Von dieser Lösung werden 10µl zu den 990µl PBS/ 2% FCS (1:100) pipettiert, die in der ersten Spalte der Platte vorgelegt wurden. Diese insgesamt 1000µl werden gründlich gemischt und 100µl davon werden in die nächste Spalte überführt (1:10). Dieser letzte Schritt wird so oft wiederholt bis in den 24-well-

Platten Verdünnungen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-13}$  vorliegen. In die zwölfte Spalte wird keine Virusverdünnung eingefüllt, sie dient für die spätere MOC (multiplicity of cells). Die Verdünnungen können über Nacht bei 4°C aufbewahrt oder direkt verwendet werden.

### 3.5.4.2 Titrierung

Bevor mit der Titration begonnen wird, müssen die Virusvorverdünnungen für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach gutem Durchmischen der einzelnen Verdünnungen werden 200µl/well auf eine mit HEK293 LP-Zellen 80% bewachsene 24-well-Platte pipettiert. Die zwölfte Spalte der Platten dient dabei als MOC (multiplicity of cells), da sie nur mit PBS/ 2% FCS behandelt wird und das natürliche Ablöseverhalten der Zellen beobachtet werden soll. Wenn alle Zellen mit ihrer Virusverdünnung behandelt wurden, werden sie für eine Stunde leicht geschüttelt. Anschließend erfolgt eine vorsichtige Mediumzugabe von 1ml MEM<sup>++</sup>/ 5% FCS pro well.

Die Lochplatten werden für 2 bis 3 Wochen im Virusbrutschrank inkubiert. Während der ganzen Titrierung erfolgt kein Mediumwechsel. Die Zellen müssen täglich auf das Vorkommen von Plaques überprüft werden.

## 3.6 Lentiviren

Die Lentiviren gehören zu der Familie der infektiösen exogenen RNA-Retroviren. Die Bezeichnung Lentivirus leitet sich vom lateinischen lentus = langsam ab, da viele dieser Viren langsam fortschreitende, chronisch degenerative Krankheiten auslösen. Zwischen 1930 und 1940 wurde bei Schafen erstmals eine Erkrankung namens Maedi-Visna entdeckt, die auf Lentiviren zurückzuführen ist. Das auslösende Virus wurde in den 1950er als Maedi-Visna-Virus (MVV) beschrieben. Die bekanntesten Lentiviren sind die humanen Immundefizienzviren (HIV-1/ HIV-2), die die schwere Immunschwächekrankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) auslösen können.

Retroviren sind die am häufigsten genutzten Vektorsysteme für den Gentransfer in hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Mit dem Ziel einer erhöhten Sicherheit in der Genterapie, wurden so genannte SIN-Vektoren (self inactivating vectors) entwickelt.

### 3.6.1 Lösungen und Medien

<b>DMEM<sup>++</sup>/10% FCS:</b>	88% (v/v) DMEM; 1% (v/v) Pen/Strep-Lsg. (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lsg. (100fach); 10% (v/v) FCS
<b>Polybrene:</b>	8mg/ml Polybrene in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
<b>Doxycyclin:</b>	1mg/ml Doxycyclin in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
<b>2x HBS:</b>	0,28 M NaCl; 0,05 M HEPES-Säure; 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7.05; sterilfiltriert
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b>	2,5 M, sterilfiltriert
<b>HEPES-Puffer:</b>	1 M (238,3g/l), sterilfiltriert
<b>DMEM<sup>++</sup>/10% FCS/Polybrene:</b>	8µg/ml Polybrene (8mg/ml) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS
<b>DMEM<sup>++</sup>/10% FCS/ Doxycyclin:</b>	1µg/ml Doxycyclin (1mg/ml) in DMEM <sup>++</sup> /10% FCS

### 3.6.2 Produktion von Lentiviren über Calciumphosphat-Transfektion

Bei der Calciumphosphat-Transfektion wird die zu transfizierende DNA mit Calcium und Phosphatpuffer gemischt, woraufhin sich ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA bildet. Dieser wird dann auf die Zellen gegeben, die diese Kristalle über Endozytose aufnehmen.

Zunächst werden  $8 \times 10^6$  HEK293-Zellen in TC-Schalen (142 cm<sup>2</sup>) gleichmäßig in 30ml Medium ausgesät und über Nacht im Zellkulturinkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Dann erfolgt die Calciumphosphat-Transfektion. Zu einem DNA-Gemisch aus den beiden Helferplasmiden pCMVΔR 8.2 (50μg/Transfektion) und pMD.Gvsyg (12,5μg/Transfektion) und dem Zielplasmid (50μg/Transfektion) werden 280μl CaCl<sub>2</sub> (2,5M) gegeben und mit dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 1,4ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wird nun unter Zufuhr von Luft mit Hilfe einer Pasteurpipette langsam zu 1,4ml HBS-Puffer getropft, 3 bis 5 Sekunden stark gemischt und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird das Medium von den zu transfizierenden Zellen entfernt und das Gemisch wird vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Zellen werden unter mehrmaligen Schwenken 15 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach werden 20ml Medium zu den Zellen gegeben und diese über Nacht im Zellkulturinkubator bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel mit 15ml DMEM<sup>++</sup>/ 10% FCS und 10mM HEPES-Puffer. Die erste Virusernte wird 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Dazu werden die 15ml Medium mit Hilfe einer Spritze aus der TC-Schale entnommen und durch einen 0,45μm Filter (Sartorius) in ein Falcon-Röhrchen filtriert. Dadurch werden Zellrückstände entfernt. Die Viruslösung wird über Nacht bei 4°C gelagert. Die Zellen werden mit 15 ml frischem DMEM<sup>++</sup>/ 10% FCS und 10mM HEPES-Puffer versetzt und weitere 24 Stunden im Zellkulturinkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die zweite Virusernte, wobei erneut das Medium mittels einer Spritze aus der TC-Schale entnommen wird und durch einen Filter zur Viruslösung der ersten Virusernte gegeben wird. Die Viruslösung wird aliquotiert und bei -70°C gelagert.

### 3.6.3 Titerbestimmung

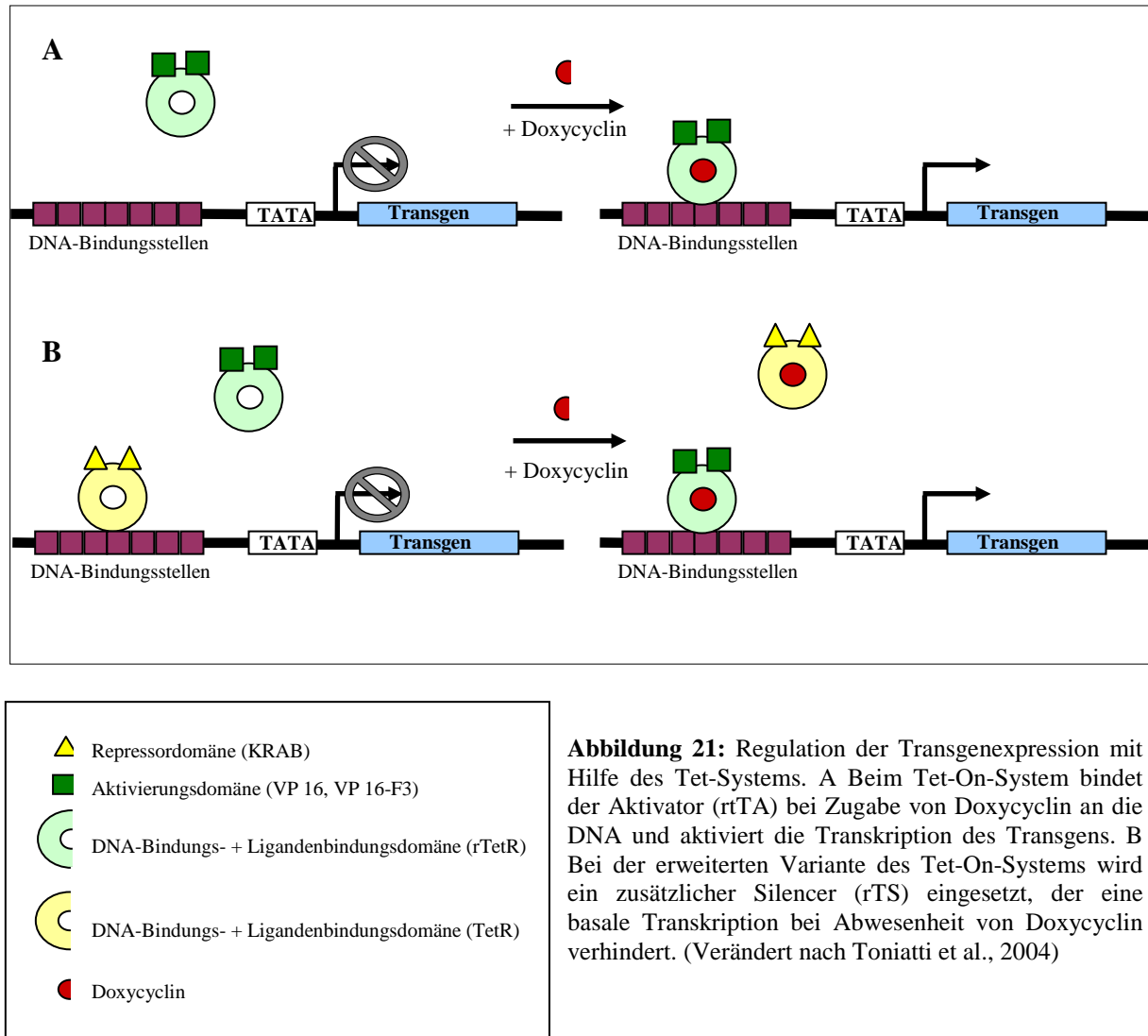
Zur Bestimmung des Titers werden 10μl Virusüberstand mit 50μl TRIzol-Reagent<sup>®</sup> (RNA/DNA/Protein Isolation Reagent, Invitrogen) gemischt. Die RNA-Isolierung erfolgt wie unter 3.1.11 beschrieben. Allerdings werden die Volumina der geringeren Menge angepasst, die RNA in 11,6μl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend 15 Minuten bei 58°C inkubiert. Die folgende Synthese der cDNA wird wie unter 3.1.12 beschrieben durchgeführt, wobei anstatt des Oligo-dT<sub>12-18</sub>-Primers ein vektorspezifischer reverse-Primer eingesetzt wird. Mit der synthetisierten cDNA wird eine RT-PCR (siehe 3.1.1) durchgeführt. Als Template dienen zum einen Verdünnungen der cDNA (unverdünnt, 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup>) und zum anderen Verdünnungen des transfizierten Vektorkonstruktes (10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg). Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der cDNA-Verdünnungen und der Vektorverdünnungen ist es möglich, die Menge an Vektor-DNA, die sich in der aus dem Virusüberstand isolierten cDNA befindet, abzuschätzen. Über das Molekulargewicht des Vektors und die Avogadro-Konstante ( $6,023 \times 10^{23}$ ) kann die Anzahl der Viruspartikel im Überstand ermittelt werden. Der ermittelte Titer dient bei späteren Lentivirusinfektionen dazu, eine bestimmte Anzahl von Viren pro Zelle für die Infektion einsetzen zu können, die so genannte MOI (multiplicity of infection).

### 3.6.4 Regulierbare Genexpression: Das Tet-System

Für viele Anwendungen ist eine regulierbare Genexpression von Vorteil, wie beispielsweise bei der Erforschung der Genregulation und Genfunktion während der Entwicklung oder für die Analyse der Funktion spezifischer Gene an verschiedenen biologischen Prozessen. Ein gängiges regulierbares Expressionssystem ist das von Gossen und Bujard 1992 entwickelte Tetracyclin-regulierbare System, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde und im Folgenden detaillierter beschrieben wird.

Bei dem Tetracyclin-regulierbaren Tet-ON und Tet-OFF System kommt ein heterologes bakterielles Regulationssystem zum Einsatz, welches in eukaryotischen Zellen ansonsten nicht existiert. Durch dieses System kann die Expression eines Transgens kontrolliert an- und ausgeschaltet werden. Das System basiert auf zwei Regulationselementen, die vom Tetracyclin Resistenz Operon des *E.coli* Tn10-Transposons abgeleitet sind: dem Tet-

Repressor Protein (TetR) und der Tet-Operator Sequenz (TetO). Die Operon Sequenz wurde mit einem minimalen eukaryotischen Promotor, dem immediate early Cytomegalovirus (CMV) ligiert. Die Transkription der nachgeschalteten Gene ist nur nach Bindung eines co-exprimierten chimären Transaktivators (rtTA) möglich (Hillens und Berens, 1994). Dieser Transaktivator besteht aus der TetR zur Bindung an den Promotor, die mit der viralen Aktivierungsdomäne VP16 des Herpes simplex Virus zur Aktivierung der Expression fusioniert ist (Toniatti et al., 2004; Chernajovsky et al., 2004).



**Abbildung 21:** Regulation der Transgenexpression mit Hilfe des Tet-Systems. A Beim Tet-On-System bindet der Aktivator (rtTA) bei Zugabe von Doxycyclin an die DNA und aktiviert die Transkription des Transgens. B Bei der erweiterten Variante des Tet-On-Systems wird ein zusätzlicher Silencer (rTS) eingesetzt, der eine basale Transkription bei Abwesenheit von Doxycyclin verhindert. (Verändert nach Toniatti et al., 2004)

Beim dem Tet-On-System (Abbildung 21 A) wird ein mutiertes TetR-Ren (reverses TetR, rTetR) eingesetzt. Durch Zugabe und Bindung des Liganden Tetracyclin oder eines seiner Derivate (zum Beispiel Doxycyclin) kann der Transaktivator (rtTA) an den Promotor binden und die Transkription aktivieren.

In einer weiteren Variante des Tet-On-Systems (Abbildung 21 B) wird eine stringenter Kontrolle der Expression des eingebrachten Transgens durch ein Doxycyclin-abhängigen Silencer (rTS) erreicht. Dieser Silencer ist aus einer KRAB-Repressordomäne (KRAB: Krüppel-associated box) und dem Transaktivator TetR aufgebaut. Wenn bei Abwesenheit von Doxycyclin rTS und rtTA coexprimiert werden, bindet rTS an die Promotorsequenz (TetO). Dadurch wird die basale Transkription des Transgens verhindert. In Anwesenheit von Doxycyclin bindet dieser Ligand an rTS und löst eine allosterische Veränderung dieser Moleküle aus. Durch diesen Prozess kann sich der Silencer von der DNA lösen, während der



Aktivator an die Promotorsequenz bindet und die Transkription des Transgens aktiviert (Toniatti et al., 2004; Chernajovsky et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit ist die zweite Variante des Tet-On-Systems zum Einsatz gekommen.

### **3.6.5 Lentivirus-Infektionen und Kinetik der Zelldifferenzierung**

Die Zellen, die mit Lentiviren infiziert werden sollen, werden zunächst mit  $5000\text{c}/\text{cm}^2$  in kleine Kulturflaschen ausgesät. Einen Tag nach der Aussaat erfolgt die Infektion der Zellen mit den Lentiviren. Bei Verwendung von Lentiviren mit pLox-Vektorkonstrukt wird eine Co-Infektion beziehungsweise eine Tripel-Infektion mit dem MIK-Lentivirus und einem oder zwei Lentiviren, die das Transgen enthalten, durchgeführt. Die MOI (multiplicity of infection) variiert bei den einzelnen Versuchen von 50 bis 100 und muss für die einzelnen Viren zum Teil zuvor in Testinfektionen untersucht werden.

Durch den MIK-LV [rtTA2S-M2 (Transaktivator), IRES und KRAB (Repressor)] ist bei den pLox-basierten Lentiviren eine Regulation der Transgenexpression über das Tet-On-System möglich.

Für die Infektion werden die Lentiviren zunächst in einer entsprechenden Menge Medium (4 ml pro kleine Kulturflasche), das  $8\mu\text{g}/\text{ml}$  Polybrene enthält, verdünnt. Polybrene (1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylene) ist ein positiv geladenes Polymer, das an die Oberfläche von Zellen bindet und deren Ladung neutralisiert. Dadurch ist es den viralen Glykoproteinen eher möglich, an entsprechende Rezeptoren der Zelloberfläche zu binden, wodurch die Effizienz der Infektion erheblich gesteigert werden kann. Schließlich wird das Medium mit den Viren auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden erfolgt der erste Mediumwechsel (5ml pro kleine Flasche). Bei Infektion mit Viren mit dem pLox-Vektorkonstrukt wird bei jedem Mediumwechsel  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  Doxycyclin dem Medium zugesetzt. Im Laufe der Kinetik wird alle zwei Tage das Medium gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz (Tag 0 der Differenzierung) wird der Mediumwechsel mit Differenzierungsmedium, dem Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat zugesetzt sind, durchgeführt. An zuvor festgelegten Zeitpunkten während der Kinetik werden dann kleine Kulturflaschen zur Protein-Isolierung (siehe 3.3.1), RNA-Isolierung (siehe 3.1.11) und Fixierung mit PFA (siehe 3.4.8) verwendet.

## **3.7 Analyse ektopischer Implantationen von Kollagenschwämmen in Mäusen**

### **3.7.1 Implantation von Kollagenschwämme**

Zunächst werden die Zellen, die implantiert werden sollen, vorbereitet. Entsprechend der gewünschten Anzahl an Implantationen werden C310T1/2-Zellen oder huMSC in kleine Kulturflaschen mit  $5000\text{c}/\text{cm}^2$  ausgesät. Nachdem die Zellen 90% gewaschen sind, werden sie mit den entsprechenden Lentiviren, die das zu untersuchende Transgen tragen, infiziert. Bei der Verwendung von pLox-basierten Lentiviren wird den Mäusen 3 bis 5 Tage vor Versuchsbeginn bereits  $200\mu\text{g}/\text{ml}$  Doxycyclin in das Trinkwasser gegeben. Über die Dauer des Versuches wird das Trinkwasser zweimal in der Woche gewechselt. Am Tag nach der Infektion der Zellen erfolgt ein Mediumwechsel. Nach weiteren zwei Tagen werden die Zellen aus den kleinen Flaschen auf  $3 \times 3 \text{ mm}$  große Kollagenschwämme (hergestellt aus der Achillessehne des Rinds, DuraGen) umgesiedelt. Dazu werden die Kollagenschwämme je in ein Loch einer 24-Loch-Platte gelegt. Die Zellen in den kleinen Kulturflaschen werden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in 4ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wird 10 Minuten bei  $600 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in  $35\mu\text{l}$  Medium aufgenommen. Die Zellsuspension (ca.  $50\mu\text{l}$ ) wird langsam von oben auf den Kollagenschwamm in der 24-Loch-Platte getropft und für zwei bis drei Stunden im Zellkulturinkubator inkubiert. Danach wird je 1ml Medium zu jedem Kollagenschwamm gegeben und erneut zwei bis drei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wird

der Schwamm in PBS vorsichtig gewaschen und in ein mit Medium gefülltes Loch einer 24-Loch-Platte überführt. Am nächsten Tag wird das Schwämmchen zum Transport in ein mit Medium gefülltes Kryo-Röhrchen gegeben.

**Narkosezusammensetzung:** 100mg/kg Ketamin (10mg/ml); 4mg/kg Xylazin (23,3mg/ml)

Die Narkose wird interperitoneal, das bedeutet durch das Bauchfell, gesetzt und zwar auf der Höhe oberhalb der Beine. Nach circa 15 Minuten kann die Maus operiert werden. Dazu wird die Maus auf dem Tisch fixiert und die Operationsstelle mit Braunoderm (Braun) desinfiziert. Auf der Höhe des linken Oberschenkelmuskels wird mit einem Skalpell ein kleiner Schnitt in die Oberhaut gesetzt. Mit einer Pinzette kann nun die Oberhaut von der Unterhaut getrennt werden. Die intramuskuläre Implantation erfolgt in den linken Oberschenkelmuskel, in den mit Hilfe des Skalpells und einer spitzen Schere eine kleine Muskeltasche geformt wird. In diese wird ein Kollagenschwamm platziert. Die Muskeltasche wird mit einer Naht zugenäht. Für die subkutane Implantation wird erneut die Oberhaut gelockert und ein zweiter Kollagenschwamm wird subkutan platziert. Anschließend wird die Operationswunde mit zwei Nähten verschlossen. Die Maus sollte nach circa 45 Minuten wieder aufwachen. Nach der Operation wird die Maus, bis sie aufwacht, unter eine Wärmelampe gelegt, um eine Unterkühlung auszuschließen.

### 3.7.2 Explantation der implantierten Kollagenschwämme

Nach zwei bzw. vier Wochen wird der Kollagenschwamm aus der Maus explantiert. Der Schwamm kann direkt in Tissue Tek (Richard-Allan Scientific Neg-50 Frozen Section Medium) eingebettet und für 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff gegeben. Bis zur weiteren Verwendung können die so eingebetteten Schwämme bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Ebenfalls können die Schwämme für bis zu 24 Stunden in Formalin aufbewahrt werden, um anschließend in Paraffin eingebettet zu werden.

Mit Hilfe des Mikrotom-Kryostaten werden von den eingebetteten Schwämmen 7 bis  $10\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Dazu werden die Schwämme 30 Minuten vor dem Schneiden in den Mikrotom-Kryostaten gelegt. Die Durchführung der Schnitte am Kryostaten erfolgt nach Angaben des Herstellers. Zunächst werden alle fünf Schnitte, später alle zehn Schnitte auf SuperFrost Objektträger (Roth) gezogen. Diese werden dann getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Um feinere Schnitte von  $3\mu\text{m}$  zu erhalten, können die Schwämme in Paraffin eingebettet und geschnitten werden. Dieses wurde von Prof. Dr. Achim D. Gruber vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Weitere Paraffineinbettungen sowie histologische Untersuchungen wurden von der Histopathologischen Einheit des Helmholtz-Zentrums für Infektionseinheit in Braunschweig unter der Leitung von Reinhard von Wasielewski durchgeführt.

### 3.7.3 Histologische Färbungen

#### 3.7.3.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H & E-Färbung)

Bei der H&E-Färbung handelt es sich um eine progressive Färbung. Das bedeutet, dass so lange gefärbt wird, bis die optimale Färbung erreicht ist. Es ist eine allgemeine Übersichtsfärbung in der Histologie. Hämatoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischen Retikulum sind, blau-violett. Eosin färbt andere Zytoplasmaanteile und viele faserige extrazelluläre Komponenten rot. Zunächst werden die Objektträger mit den Schnitten für 20 Minuten in Roti Histofix 4% (Roth) fixiert und anschließend 5 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Dann folgt die Färbung in Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Sigma-Aldrich) für 3 bis 10 Minuten je nach zu färbendem

Material. Es wird erneut 5 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Nach 2 bis 3 Sekunden in acidic ethanol (70% Ethanol mit 6,75 ml konzentrierter HCl/ 200 ml) wird wiederum 5 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Danach werden die Schnitte zuerst 2 Minuten in 70% Ethanol und dann 2 Minuten in 90% Ethanol gegeben. Es folgt die Färbung in Eosin (EosinY Lösung mit Phloxin, Sigma-Aldrich) für 2 bis 5 Minuten. Nach 2 bis 3 Sekunden in 90% Ethanol werden die Schnitte dreimal für 2 Minuten in 100% Ethanol und dann dreimal 3 Minuten in Xylol inkubiert. Die getrockneten Schnitte werden mit Entellan (Entellan® Neu, Merck) beschichtet und eingedeckelt.

### **3.7.3.2 Toluidinblau-Färbung**

Toluidinblau ist ein basischer Farbstoff, der selektiv an die negativ geladenen Phosphatgruppen von DNA und RNA bindet. Zellkerne und ribosomenreiche Regionen werden blau gefärbt, ebenso wie Kollagenfasern. Mineralisierte Hartgewebe erscheinen ungefärbt bis blassblau und Mastzellengranula und Knorpelmatrix färben sich rotviolett. Zunächst werden die Schnitte 20 Minuten in Roti Histofix 4% (Roth) fixiert. Dann folgt eine absteigende Alkoholreihe mit jeweils 5 Minuten Inkubation in 98%, 96%, 90%, 80% und 70% Isopropanol. Die Färbung in Toluidinblau-Lösung (0,1g Toluidinblau O von Sigma in 100ml Isopropanol, Lösung dunkel halten) variiert von 3 Stunden bis 8 Stunden je nach anzufärbendem Material. Anschließend folgt eine aufsteigende Alkoholreihe mit je 1 Minute Inkubation in 70%, 80% und 90% Isopropanol und zweimal 3 Minuten in 100% Isopropanol. Abschließend wird 3 Minuten in Xylol inkubiert. Die getrockneten Schnitte werden mit Entellan (Entellan® Neu, Merck) beschichtet und eingedeckelt.

### **3.7.3.3 Trichrom-Färbung nach Goldner**

Bei der Trichrom-Färbung nach Goldner werden Farbstoffe eingesetzt, die die Kerne braunschwarz, das Zytoplasma schwachorange bis rot, die Erythrozyten leuchtend rot, das Bindegewebe grün und das Muskelgewebe blassrot färben. Zunächst werden die Schnitte mit Weigert's Eisenhämatoxylin für 1-2 Minuten gefärbt und im Anschluss für 15 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Es folgt eine Färbung mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophorin für 5 Minuten. Der überschüssige Farbstoff wird durch 1%iger Essigsäure abgespült.

### **3.7.3.4 Von Kossa-Färbung**

Bei dieser Färbung wird das Kalzium direkt in den Zellen nachgewiesen. Dabei wird das positive Gewebe dunkel angefärbt. Zunächst wird die Probe zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in 10% Formalin/PBS fixiert. Es erfolgt erneut ein Waschschriff mit PBS und zweimal mit Wasser. Die Anfärbung des Kalziums erfolgt durch einen 30-minütigen Inkubationsschritt des Gewebes in einer 5% Silbernitratlösung (50mg/ml) bei Tageslicht. Bei positivem Nachweis ist bereits eine Verfärbung zu erkennen. Im Anschluss wird die Probe in Wasser gespült und dann für 2 bis 3 Minuten in 1% Pyrogallol-Lösung (10mg/ml) gehalten. Es erfolgt erneut ein Waschschriff in mit Wasser. Beim letzten Färbeschriff wird die Probe 2 bis 3 Minuten lang in 5% Natriumthiosulfat (50mg/ml) getaucht. Zum Abschluss erfolgen nochmals zwei Waschschriffe in Wasser. Die Proben werden luftgetrocknet und anschließend mit Entellan (Entellan® Neu, Merck) beschichtet und eingedeckelt.

## **3.7.4 Immunhistochemische Färbungen**

### **3.7.4.1 $\beta$ 2-Mikroglobulin Färbung**

Der Nachweis von  $\beta$ 2-Mikroglobulin in Paraffinschnitten erfolgte durch einen  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörper. Dazu wurde zunächst das Paraffin der Gewebeschnitte durch 2faches Waschen für jeweils 10 Minuten entfernt. Die Schnitte wurden dann in der

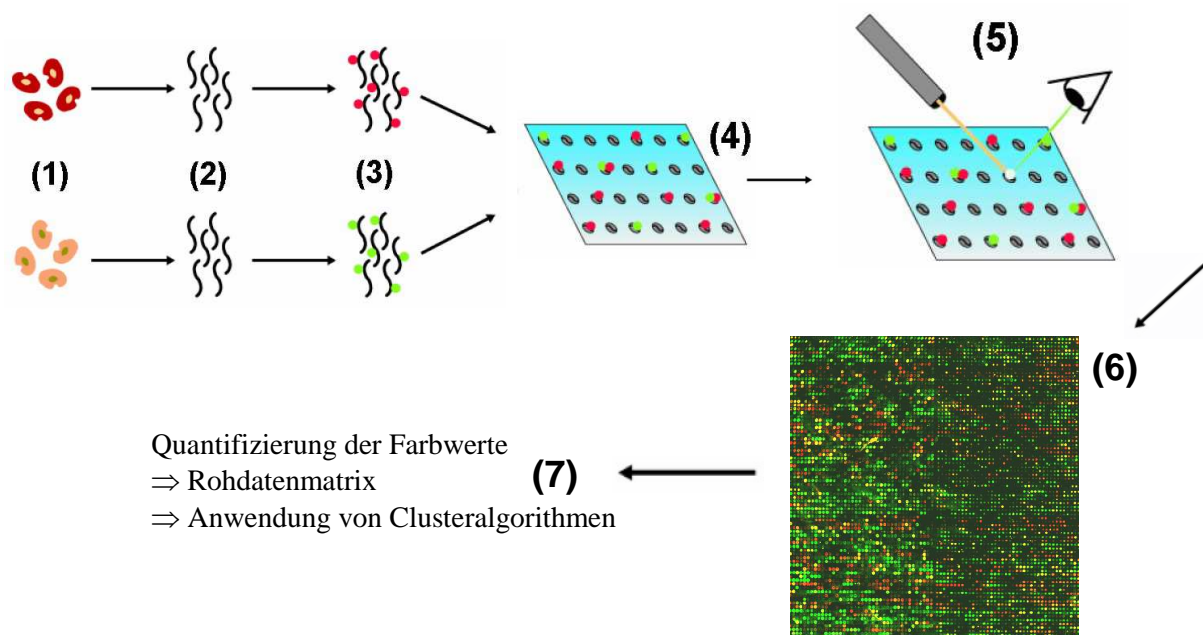
absteigenden Alkoholreihe (95%, 80%, 70%, 5 Minuten) bis hin zum destillierten Wasser hydratisiert. Es folgte eine Demaskierung durch eine 30-minütige Trypsinbehandlung bei 37°C. Im Anschluss wurden die Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in Ziegsenrum (1:5) blockiert. Der  $\beta$ 2-Mikroglobulin wurde 1:200 in PBS/BSA verdünnt und über Nacht und bei 4°C auf den Proben inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Behandlung der Proben mit dem 2ten Antikörper goat-anti-rabbit 1:200 verdünnt. Der Nachweis erfolgte mit der DAB-Färbung (5 Minuten inkubieren). Als Gegenfärbung eignete sich ein Eintauchen der Probe in Hämalaun für 9 Sekunden. Im Anschluss wurden die Präparate luftgetrocknet und mit Entellan (Entellan<sup>®</sup> Neu, Merck) beschichtet und eingedeckelt.

### 3.7.4.2 Kollagen Typ III- und GFP-Antikörperfärbung

Der Nachweis von *Kollagen Typ III* bzw. GFP in Paraffinschnitten erfolgte durch einen *Kollagen Typ III*- bzw. GFP-Antikörper. Dazu wurde zunächst das Paraffin der Gewebeschnitte durch 2faches Waschen für jeweils 10 Minuten entfernt. Die Schnitte wurden dann in der absteigenden Alkoholreihe (95%, 80%, 70%, 5 Minuten) bis hin zum destillierten Wasser hydratisiert. Es folgte eine Demaskierung durch eine 30-minütige Trypsinbehandlung bei 37°C. Im Anschluss wurden die Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in Ziegsenrum (1:5) blockiert. Die Kollagen Typ III- bzw. GFP-Antikörper wurden 1:200 in PBS/BSA verdünnt und über Nacht und bei 4°C auf den Proben inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Behandlung der Proben mit dem 2ten fluoreszierenden Antikörper goat-anti-rabbit 1:200 verdünnt. Im Anschluss wurden die Präparate luftgetrocknet und mit Entellan (Entellan<sup>®</sup> Neu, Merck) beschichtet und eingedeckelt.

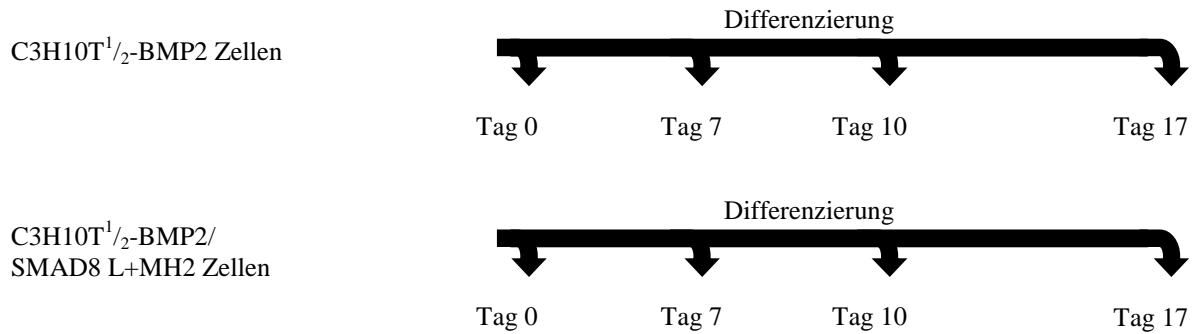
### 3.7.5 Microarray

Beim Microarray handelt es sich um ein modernes molekularbiologisches Untersuchungssystem, welches eine parallele Analyse und Auswertung tausender Genexpressionsprofile erlaubt. Das Ziel ist die Erkennung und Korrelierung von Veränderungen bei der Genexpression zum Gruppieren ähnlicher Genprofile. In dieser Arbeit wurde ein Microarray zur differentiellen Genexpressionanalyse durchgeführt.



**Abbildung 22:** Prozess der Microarray-Genexpression

Für die Microarray-Analyse wurde eine Differenzierungsstudie mit den Zelllinien C3H10T1/2-BMP2 (Kontrollzellen) und C3H10T1/2-BMP2/SMAD8 L+MH2 wie folgt durchgeführt.



An diesen vier Zeitpunkten wurde die RNA isoliert (siehe 3.1.11). 20µg der totalen RNA aller Proben wurden in cDNA umgeschrieben. Für den Microarray wurden die Kontrollzellen versus der differenzierten Smad8 L+MH2-Zellen in einer feuchten Kammer für 16 Stunden bei 42°C co-hybridisiert. Dabei wurde jeweils der Tag Null mit dem Tag 7, Tag 10 bzw. Tag 17 verglichen. Im Anschluss wurden die Proben von jedem Zeitpunkt mit einem Farbstoff (Cy3 und Cy5) markiert (durchgeführt von Ulrike Nuber, Lund, Sweden)

Die Auswertung des Microarrays erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensitäten der Farbstoffe bei 532nm und 635nm mit einem Laserscanner (Affymetrix 428 ArrayScanner, Affymetrix). Die resultierenden 16-bit Data-file wurden in das Programm Microarray Suite image analysis software version 2.0 importiert und ausgewertet. Alle Daten wurden durch Anwendung des Programms bioconductor normalisiert (<http://www.bioconductor.org>). Im Vorfeld wurden Parameter festgelegt, nach denen die Gene in Cluster einsortiert werden sollten. Zu diesen gehörten die Intensität der Genexpression der einzelnen Gene zu Beginn der Differenzierung und der Verlauf der Expression während der Kinetik.

## 4 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war über die Differenzierung von Zellen in die Sehnenrichtung wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Signalwege bei einer stammzellabhängigen Differenzierung zu Sehnengewebe. Dazu sollte ein Mausmodell etabliert werden, mit welchem Sehnensbildung ectopisch untersucht werden kann. Des Weiteren war es das Ziel zu untersuchen, welche Faktoren bei der Sehnendifferenzierung eine Rolle spielen könnten. Dazu sollten mit Hilfe einer Microarray Analyse Faktoren gefunden werden, die in der Sehnensentwicklung involviert sein könnten. Letztendlich sollten diese Ergebnisse einen Beitrag zur Zell-/Gentherapie von degenerierten und gerissenen Sehnen leisten.

### 4.1 Auswirkungen von Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung von rekombinant exprimierenden C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen

Zur Konstruktion einer konstitutiv aktiven Variante von Smad8 (Smad8 L+MH2) wurde die MH1-Domäne entfernt, so dass diese die Funktionalität der MH2-Domäne durch eine räumliche Interaktion nicht mehr behindern kann.

In vorangegangenen Studien wurde von dieser Arbeitsgruppe bereits untersucht, welche Auswirkungen Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung von C3H10T1/2- und C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen hat (Hoffmann et al., 2006).

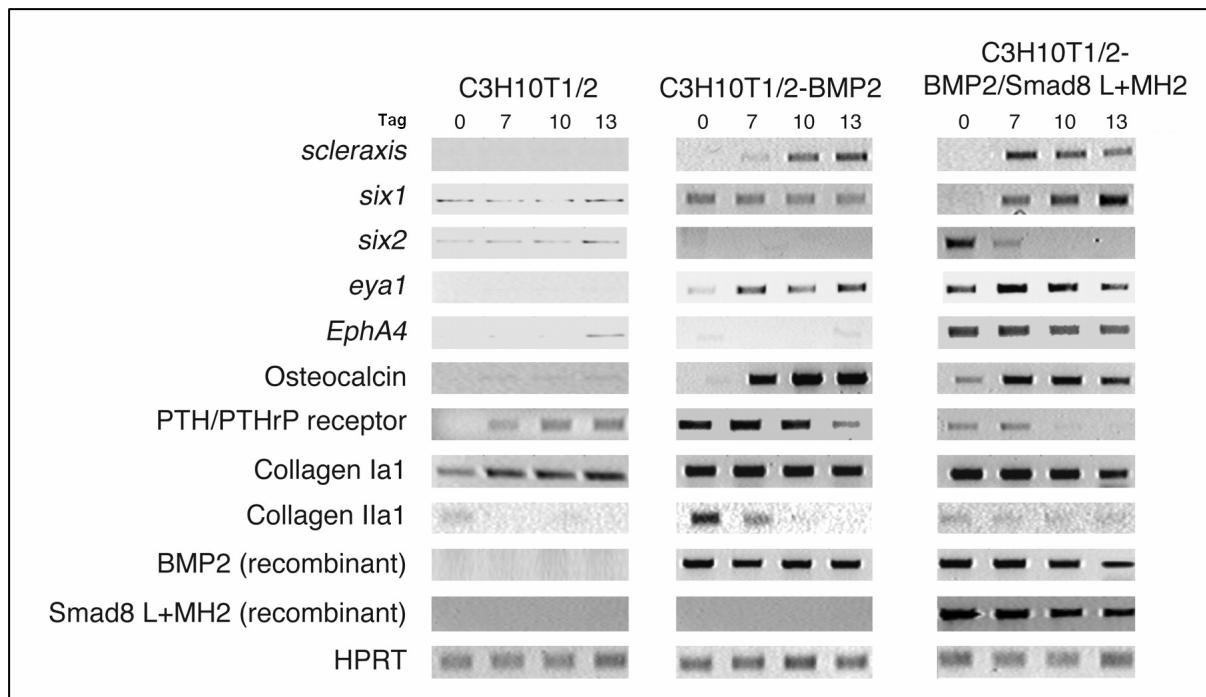
Dazu wurden ursprünglich zunächst die Expressionsvektoren für BMP2 (bone morphogenetic protein) und Smad8 L+MH2 stabil in die fibroblastoide mesenchymale Vorläuferzelllinie C3H10T1/2 transfiziert. Im Anschluss wurde mit diesen Zelllinien Untersuchungen des Differenzierungspotentials durchgeführt. Die Zellen wurden zum einen histologisch und zum anderen molekularbiologisch untersucht. Um eine Übersicht über das Differenzierungsverhalten der Zellen zu erhalten, wurden die Zellen mit der Alkalischen Phosphatase angefärbt, die in reifen Osteoblasten exprimiert wird. C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen differenzierten in kuboidale osteoblasten-ähnliche Zellen. Bei der *in vitro* Überexpression von Smad8 L+MH2 in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen hat hingegen eine Differenzierung in lang gestreckte sehnen-ähnliche Zellen stattgefunden.

Mit Hilfe von Markergenen sollte nun die Differenzierungsrichtung der Zellen untersucht werden. Für die Tendogenese sind bisher aber keine spezifischen Markergene definiert. Es wurden also Faktoren untersucht, die in Sehnen exprimiert werden, aber auch in anderen Geweben.

#### 4.1.1 Untersuchung der Genexpression bestimmter Markergene in C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen während der Differenzierung

Um die unter 4.1 erwähnten histologischen Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Expression von Markergenen untersucht (Abbildung 23). Diese Untersuchungen sollten erhärten, dass eine tendogene Differenzierung der C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen stattgefunden hat. Potentielle Markergene für die Tendogenese sind der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor *Scleraxis*, die Transkriptionsfaktoren *Six1* und *Six2* sowie *Eya1*, das Transmembranprotein *EphA4* und bestimmte Kollagen-Proteine.

Alle RT-PCRs wurden unter Standardbedingungen mit einer Zykluszahl von 30 durchgeführt (siehe 3.1.1).



**Abbildung 23:** Expression bestimmter Markergene während einer Differenzierungsstudie in den Kontrollzellen C3H10T1/2 und den rekombinanten Zelllinien C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> an den Tagen 0, 7, 10 und 13. Die RT-PCRs wurden mit den 1:10 Verdünnungen der jeweiligen cDNA durchgeführt (Ausnahme HPRT: 1:100 Verdünnung).

*Scleraxis* ist ein basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor, dessen frühe Expression die Vorläuferzellen von Sehnen und Bändern in der Embryogenese markiert. Da *Scleraxis* sowohl in den Sehnenvorläuferzellen des Syndetoms als auch in den differenzierten Sehnen und Bändern exprimiert wird (siehe 1.2), ist dieser Transkriptionsfaktor ein wichtiges Markergen für die Tendogenese. In den BMP2-exprimierenden Zellen nahm die Expression von *Scleraxis* vom 7. bis zum 13. Tag stetig zu. In den BMP2 und Smad8 L+MH2-exprimierenden Zellen wurde *Scleraxis* am 7. Tag am stärksten exprimiert. Diese Expression könnte somit ein Hinweis auf eine stammzellabhängige Differenzierung in Sehnenzellen sein.

Bei dem Markergen *Six1* handelt es sich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor, der in entwickelnden Sehnen exprimiert wird. Somit könnte die Expression von *Six1* ebenfalls einen Hinweis auf eine Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in Richtung Tendogenese geben. In den Kontrollzellen als auch in den Zellen mit BMP2-Hintergrund war eine kontinuierlich schwache Expression von *Six1* während der Differenzierung wahrzunehmen. In den C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> stieg die Expression von *Six1* jedoch kontinuierlich an. Am 7. Tag war die Expression bereits höher als während der ganzen Kinetik in den BMP2-exprimierenden Zellen. Die *Six1*-Expression könnte somit auch ein Hinweis für eine stattgefundene Sehnendifferenzierung in C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-exprimierenden Zellen sein.

Ebenfalls wie bei *Six1* handelt es sich bei *Six2* um einen Transkriptionsfaktor, der in entwickelnden Sehnen exprimiert wird. In den BMP2-exprimierenden C3H10T1/2-Zellen konnte keine Expression von *Six2* festgestellt werden. In den C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> wurde *Six2* bereits am Tag der Konfluenz (Tag 0) sehr stark exprimiert. Am 7. Tag der Differenzierung nahm die Genexpression von *Six2* wieder ab. An Tag 10 konnte keine Expression mehr wahrgenommen werden. Dies ist eine weitere Bestätigung, dass Smad8 L+MH2 einen Einfluss auf die Sehnenzellendifferenzierung ausüben könnte.

Bei *Eya1* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der zunächst in Bindegewebszellen und später in Sehnen exprimiert wird. In den Zellen mit BMP2-Hintergrund fand eine zunehmende Expression von Tag 0 zu Tag 13 statt, wobei am 10. Tag der Differenzierung ein leichter Rückgang der Expression zu erkennen war. In den C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> war die Expression von *Eya1* wesentlich höher. An Tag 0 wurde *Eya1* bereits exprimiert und nahm bis zum 7. Tag deutlich zu. Ab dem 10. Tag wurde die Expression schwächer und nahm am letzten Tag der Differenzierung den Ausgangswert von Tag 0 an. Da die Expression dieses Markergens in den C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> höher als in C3H10T1/2<sup>BMP2</sup>-Zellen exprimiert wurde, könnte auch dies ein Hinweis auf eine Entwicklung von Sehnenzellen sein.

*EphA4* ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die in den distalen Sehnen der Extremitäten exprimiert wird. Zur *EphA4* vermittelten Signalmediation wird der direkte Zell-Zell-Kontakt benötigt. In den mesenchymalen Stammzellen mit BMP2-Hintergrund war keine Expression dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinase zu erkennen. In den C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> hingegen wurde *EphA4* bereits an Tag 0 hoch exprimiert. Bis zu dem 13. Tag der Differenzierungskinetik nahm die Expression stetig ab. Dieses Expressionsverhalten deutet auf eine Sehnenzellbildung in C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> hin.

*Osteocalcin* zählt zu den späten Markergenen der Osteogenese, da es ausschließlich im Knochen exprimiert wird. Es handelt sich um ein aus 49 Aminosäuren bestehendes Protein, das  $\gamma$ -carboxyglutaminsäurehaltig ist und  $\text{Ca}^{2+}$  bindet. Mit 10 bis 20% macht es den Hauptbestandteil der nicht-kollagenen Proteine der Knochenmatrix aus. Mesenchymale Stammzellen, in denen ausschließlich BMP2 rekombinant exprimiert wurde, zeigten einen deutlichen Anstieg der *Osteocalcin*-Expression über den Differenzierungszeitraum von 13 Tagen. An Tag 0 war keine Expression zu erkennen. Ab dem 7. Tag stieg die Expression deutlich an und nahm bis zum 13. Tag drastisch zu. In den Zellen, die neben BMP2 noch das Smad8 L+MH2-Konstrukt besaßen, war die Expression von *Osteocalcin* deutlich schwächer. In diesem Fall hatte die Expression am 7. Tag ihren Höhepunkt erreicht und schwächte dann bis zum 13. Tag langsam ab. Da es sich bei *Osteocalcin* um einen Marker der Osteogenese handelt, wurde dieses Expressionsmuster in den BMP2-Zellen auch erwartet.

*PTH* (Parathyroid-hormone) ist ein endokriner Faktor, der den Kalziumgehalt des Blutes reguliert. Er übernimmt zahlreiche Aufgaben im Blut und im Knochen. Zusammen mit Vitamin D<sub>3</sub> ist er für die Erhöhung des Kalziumspiegels im Blut verantwortlich, wobei *PTH* die Knochenresorption stimuliert und Vitamin D<sub>3</sub> für den Kalziumtransport verantwortlich ist. Des Weiteren beeinflusst *PTH* den Ionen- und Aminosäuretransport in Osteoblasten, stimuliert die cAMP-Synthese und reguliert ebenso die Kollagensynthese. Zur Bindung von *PTH* und dem parakrinen *PTHrP* (PTH related peptide) wird ein G-gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen benötigt. Der *PTH/PTHrP*-Rezeptor wird in Osteoblasten während der frühen Differenzierungsphase und in Chondrozyten auch in der späteren Differenzierungsphase exprimiert. In den C3H10T1/2-Zellen mit BMP2-Hintergrund wurde der *PTH/PTHrP*-Rezeptor am Tag 0 stark exprimiert und nahm dann in seiner Expressionsintensität stetig ab. Am 13. Tag war die Expression kaum mehr wahrzunehmen. In den C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> wurde der *PTH/PTHrP*-Rezeptor an den Tagen 0 und 7 ganz schwach exprimiert. An den anderen Tagen war keine Expression zu erkennen. Der Expressionsverlauf von *PTH/PTHrP*-Rezeptor in den BMP2-Zellen war typisch für eine osteoblastoide Entwicklung.

*Kollagen Typ I* ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Sehnen, das starke Fasern bildet. Die Kollagenfasern sind in ein Geflecht aus Proteoglykanen eingebettet. Allerdings kommt Kollagen auch in vielen anderen Bindegeweben wie zum Beispiel in der



Haut und in Knochen vor, allerdings nicht im Knorpelgewebe. Eine erhöhte Expression von *Kollagen Typ I* kann also ein Indiz für die Differenzierung in Sehnenzellen sein, ist aber keinesfalls spezifisch. Kollagen wird außerdem als früher Marker der Osteogenese bezeichnet. Sowohl in den Kontrollzellen als auch in den C3H10T1/2<sup>BMP2</sup> und C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup>-Zellen, wurde *Kollagen Typ I* kontinuierlich hoch über den ganzen Differenzierungszeitraum exprimiert. Lediglich in den C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> ging die *Kollagen Typ I* – Expression in den letzten Tagen leicht zurück. Anhand der *Kollagen Typ I* Expression allein kann aber keine Schlussfolgerung gezogen werden, ob eine stammzellabhängige Differenzierung von modifizierten Smad8L+MH2-Zellen in Sehnenzellen stattgefunden hat.

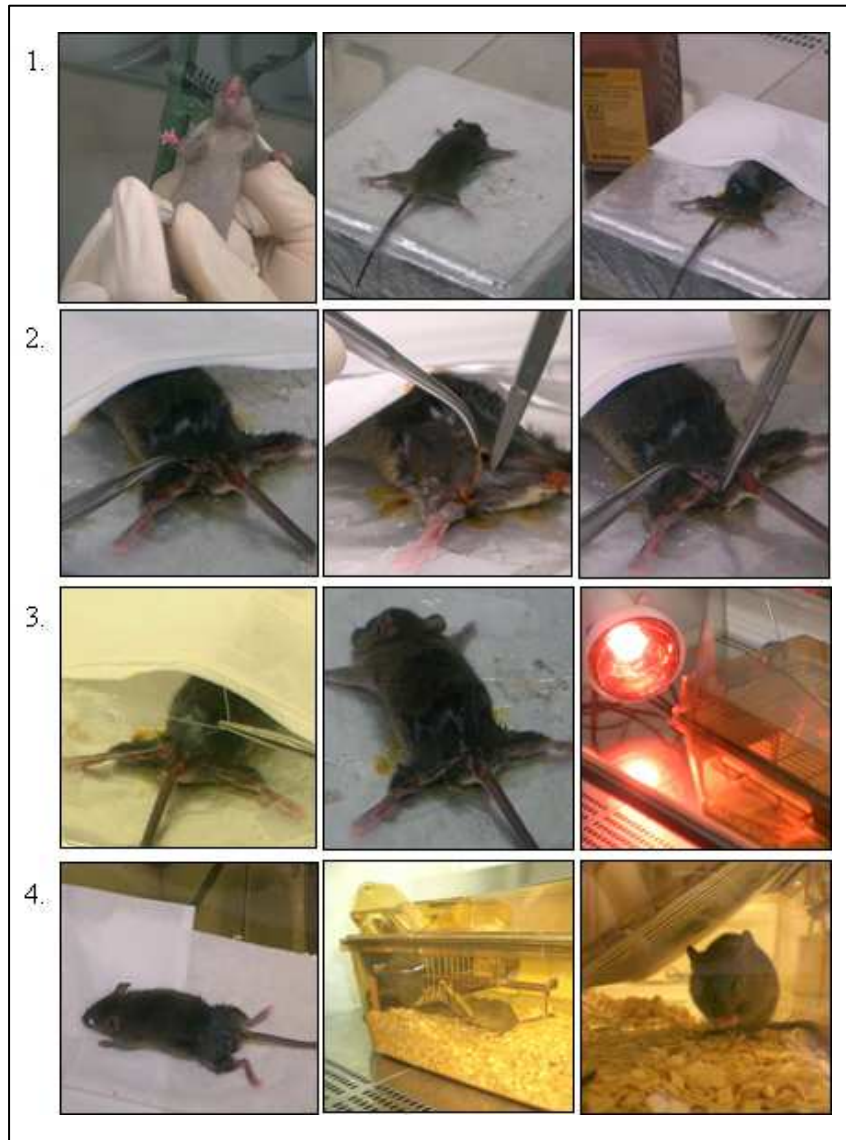
Bei dem Markergen *Kollagen Typ II* handelt es sich um ein Homotrimer aus drei  $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten. Es stellt den weitaus größten Anteil der Chondrozytenmatrix da. Daher wird *Kollagen Typ II* in die Kategorie der Chondrogenese-Markergene eingeordnet. Bereits an Tag 0 war in den Zellen mit BMP2-Hintergrund eine hohe Expression von *Kollagen Typ II* wahrzunehmen. Diese nahm aber schnell ab. Ab dem 10. Tag wurde *Kollagen Typ II* nicht mehr exprimiert. In den C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> war eine kontinuierliche schwache Expression zu erkennen. Die Kollagen-Expression zeigte somit den zu erwartenden Verlauf in den C3H10T1/2<sup>BMP2</sup>-Zellen. In den C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup>-Zellen hingegen entspricht die niedrige *Kollagen Typ II*-Expression eine mögliche Differenzierung in Sehnenzellen.

Die Expressionsverläufe dieser Markergene deuten somit darauf hin, dass eine stammzellabhängige Differenzierung zu Sehnenzellen im Smad8L+MH2/BMP2-Hintergrund stattgefunden hat. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für weitere Analysen *in vivo*.

#### 4.2 Etablierung eines Mausmodells zur Herstellung ektopischer Sehnen

Um das Differenzierungsverhalten *in vivo* zu charakterisieren, wurden die rekombinanten Zelllinien C3H10T1/2<sup>BMP2</sup> und C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> auf Kollagenschwämme gegeben und in weibliche C3H/HeN-Mäuse implantiert (siehe 3.7.1). Bei den Kollagenschwämmen der Firma Duragen handelt es sich um Kollagen, das aus der Achillessehne eines Rindes gewonnen wurde. Für die Implantationen wurde der Schwamm in 3x3 mm große Stücke geschnitten. Die modifizierten Stammzellen wurden kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz auf den Schwamm gegeben. Die Zellzahl betrug  $1,25 \times 10^6$  Zellen pro Schwamm. Im Anschluss wurden die mit Zellen besiedelten Schwämme in die Maus implantiert. Jede Maus erhielt ein subkutanes (unter die Oberhaut) und ein intramuskuläres (in den Oberschenkel-Muskel) Implantat. Nach vier Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und die Schwämme explantiert (siehe 3.7.2). Während der vierwöchigen Zeit wurden die Mäuse unter Standardbedingungen gehalten. Pro Versuchsansatz wurden 5 Mäuse operiert.

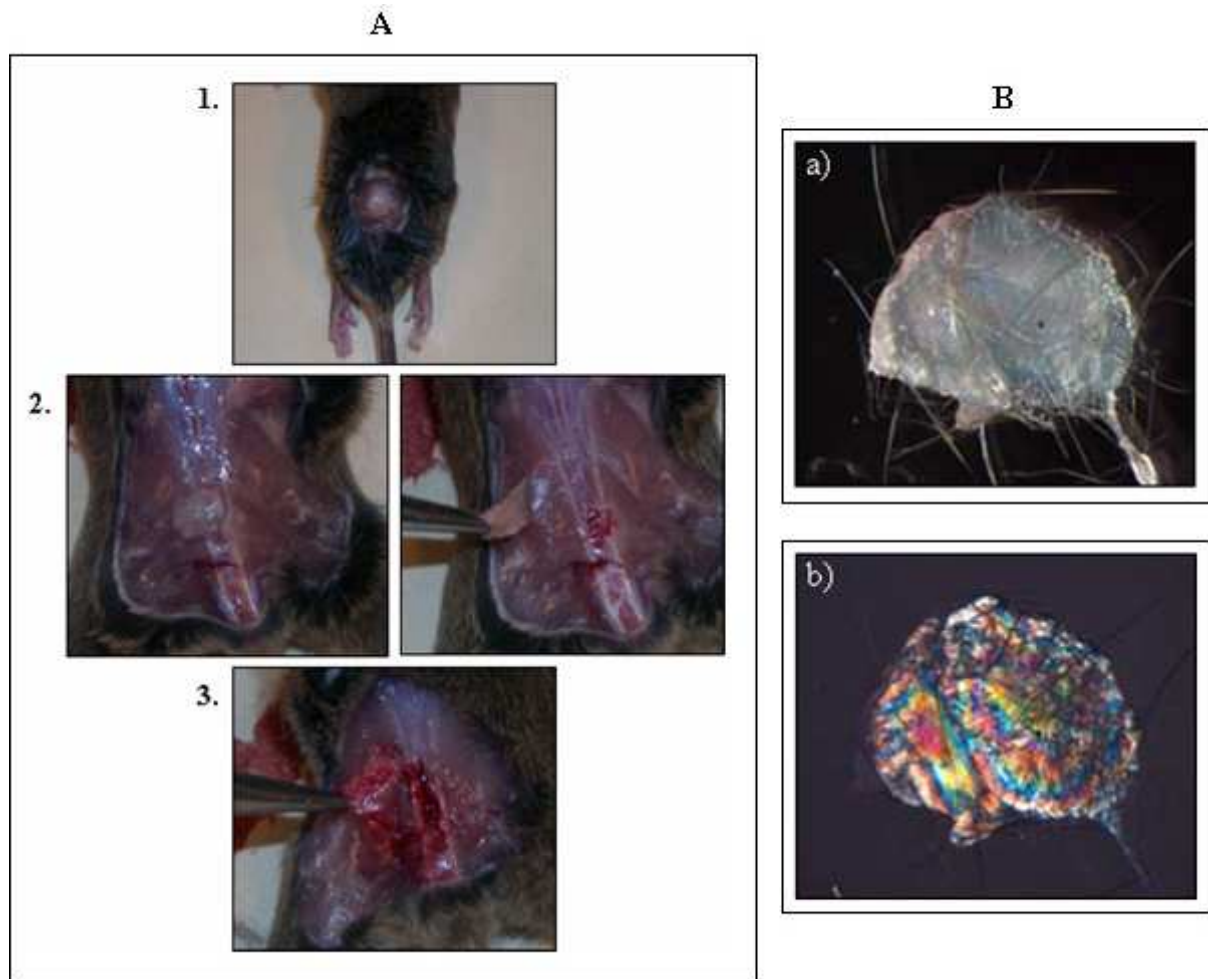
In den nächsten Abbildungen (Abbildung 24) sind die chirurgischen Handgriffe bei der Implantation eines Schwammes in den Muskel dargestellt:



**Abbildung 24:** Implantation von modifizierten mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich auf einer Trägermatrix befinden. 1) Interperitoneale Injektion der Narkose, Fixieren der Maus auf einer Unterlage, Abdecken der Maus mit einem Tuch. 2) Kleiner Schnitt oberhalb des Schwanzansatzes, Formen der intramuskulären Tasche. 3) Vernähen der Wunde, Bestrahlung mit Rotlicht. 4) Überwachung der Aufwachphase

Nach der Euthanasie wurde der subkutane Schwamm meist an seinem Implantationsort wieder gefunden. Durch die Bewegung der Maus sind aber einige subkutane Schwämme auch unter der Haut gewandert und befanden sich bei der Euthanasie auf dem Rückgrat der Maus. Je nach Art des eingebrachten Konstruktes lagen die Schwämme entweder locker auf dem Gewebe der Maus oder waren mehr oder weniger stark mit dem umliegenden Gewebe verwachsen.

Die Explantation des intramuskulären Schwammes gestaltete sich dagegen schwieriger. Nicht immer konnte der Schwamm wieder gefunden werden. Obwohl die intramuskuläre Tasche zugenäht wurde, lag der Schwamm bei einigen Mäusen auf der Muskeltasche. Vermutlich ist die Naht durch die Bewegungen der Maus wieder aufgegangen. Im Allgemeinen fand die Explantation des Implantates vier Wochen nach der Operation statt.



**Abbildung 25:** A) Explantation von BMP2/Smad8 L+MH2-modifizierten mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich auf einer Trägermatrix befinden. Die Gewebestücke sind zum Teil sehr stark mit dem Rückgrat verwachsen. 1) Locker aufliegender subkutaner Kollagenschwamm auf dem Rückgrat der Maus. 2) Der Kollagenschwamm ist leicht mit dem umliegenden Gewebe der Maus verwachsen. 3) Starke Verwachsung des Gewebepreparates mit dem umliegenden Gewebe. Er ist mit einem Gefäßstiel aus der Umgebung verwachsen und wird dadurch gut durchblutet. B) Optische Erscheinung der Gewebestücke unter einem Mikroskop. a) Durchlicht b) polarisiertes Licht

Anhand der Konsistenz und der farblichen Erscheinung des Schwammes konnten die ersten Rückschlüsse in Hinsicht auf die Differenzierung der modifizierten mesenchymalen Stammzellen geschlossen werden. Einige Schwämme waren in ihrer Konsistenz sehr elastisch und weich und hatten eine schimmernde brillant weiße Farbe (Abbildung 25 B a). Im polarisierten Licht reflektierten die Farben (Abbildung 25 B b). Diese Merkmale deuten auf die Differenzierung in Sehngewebe hin. Andere Schwämme hingegen waren wiederum sehr hart, wodurch die Vermutung nahe lag, dass eine Differenzierung in Knochengewebe stattgefunden hat.

Nach der Explantation wurden die Gewebestücke fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 3µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Von jeder Gewebeprobe wurde auf drei unterschiedlichen Stufen jeweils ein Hämatoxylin und Eosin- (siehe 3.7.3.1) und ein Toluidin Blau- (siehe 3.7.3.2) oder mit Trichrom-Färbung nach Goldner (siehe 3.7.3.3) gefärbtes Schnittpräparat angefertigt.

Die Hämatoxylin und Eosin-Färbung erlaubt eine gute Übersichtsfärbung. Hämatoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischem Retikulum sind, blau-violett. Faserige, extrazelluläre Komponenten und andere Zytoplasmateile werden durch das Eosin rot gefärbt. Toluidin Blau ist ein basischer Farbstoff, der selektiv an die negativ geladenen Phosphatgruppen von DNA und RNA bindet. Zellkerne und ribosomenreiche

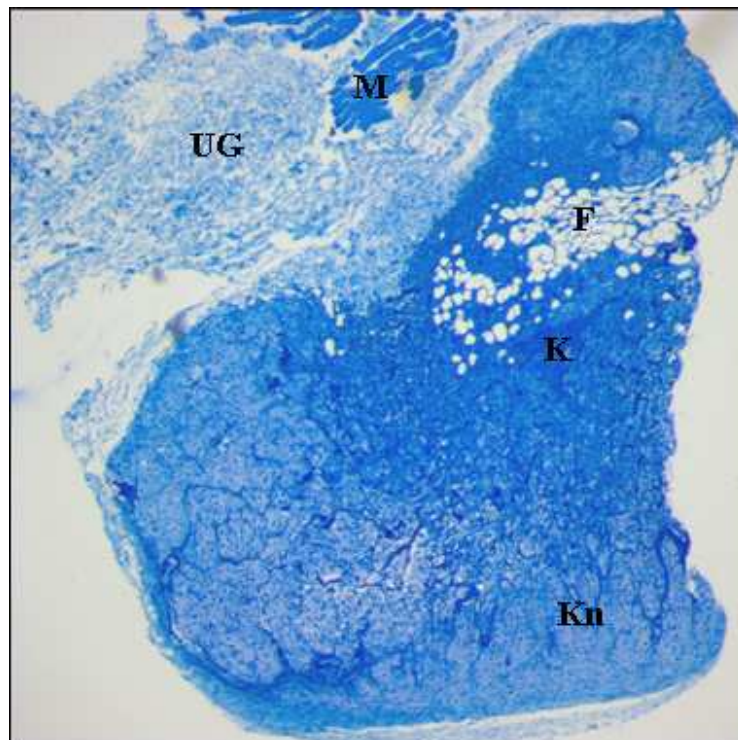
Regionen werden hellblau gefärbt, ebenso wie Kollagenfasern. Mineralisierte Hartgewebe und Knorpelmatrix werden tiefblau bis rotviolett angefärbt. Bei der Trichrom-Färbung nach Goldner werden die Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma schwachorange bis rot, die Erythrozyten leuchtend rot, das Bindegewebe grün und das Muskelgewebe blassrot gefärbt.

#### 4.2.1 Modifizierte mesenchymale Vorläuferzellen differenzieren in Knochen-, Knorpel- und Sehngewebe

Die explantierten Schwämme und Gewebeproben, die mit den C3H10T1/2<sup>BMP2</sup>-Zellen besiedelt wurden, besaßen eine sehr harte Konsistenz. Sie waren zum Teil mit dem umliegenden Gewebe stark verwachsen.

In Abbildung 26 ist ein mit Toluidin Blau gefärbtes, subkutanes und mit C3H10T1/2<sup>BMP2</sup>-Zellen besiedeltes Schnittpräparat dargestellt. Der Schwamm war mit dem umliegenden Gewebe stark verwachsen. Daher wurde bei der Explantation etwas von dem am Schwamm festgewachsenen Muskelgewebe mit herausgeschnitten. In dem gefärbten Schnittpräparat ist die Differenzierung der eingebrachten BMP2-Zellen in drei Richtungen zu erkennen: Fettgewebe (F), Knochen (K)- und Knorpelgewebe (Kn).

Die großvolumigen Zellen stellen Adipozyten da. Unter dem Einfluss des BMP2 sind die implantierten mesenchymalen Stammzellen zudem in Knochengewebe differenziert. Im unteren Teil des Präparates konnte ein Bereich mit Knorpelgewebe entdeckt werden. Eine Differenzierung der Zellen in die Sehnenrichtung war nicht festzustellen und wurde hier auch nicht erwartet.

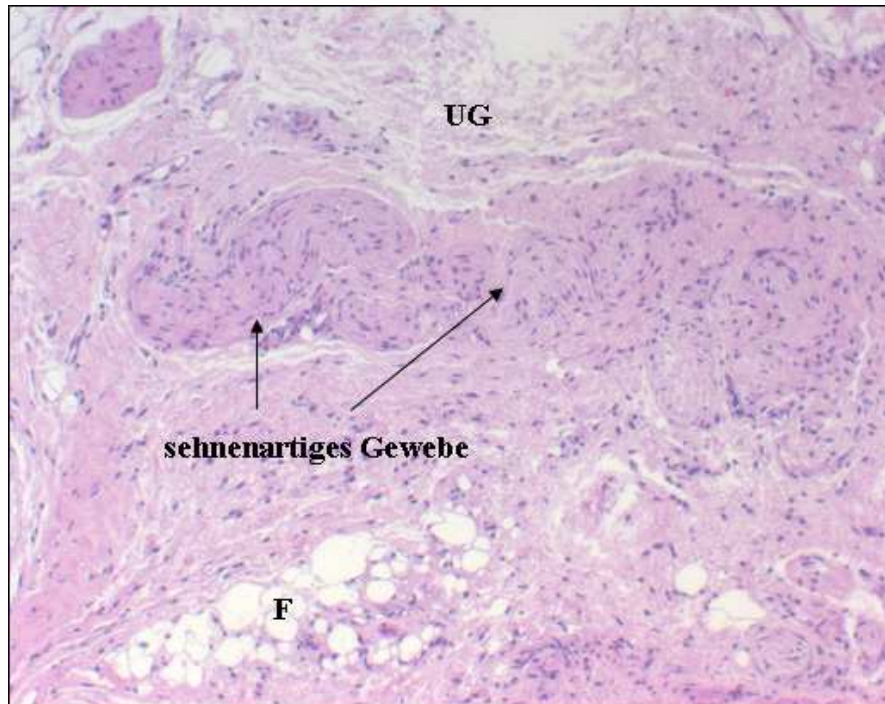


**Abbildung 26:** BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin Blau). Der Schwamm lag subkutan vor. Vergrößerung 1:5, F = Fettgewebe, K = Knochen, Kn = Knorpel, M = Muskel, UG = Unterhautbindegewebe

In der Abbildung 27 ist ein mit Hämatoxylin und Eosin gefärbtes Schnittpräparat zu sehen. Bei diesem Schnitt handelte es sich um implantierte C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8</sup> L+MH2 Zellen. Neben der Differenzierung der Zellen in Fettgewebe (F) sind wellenlinienförmige Verläufe zu erkennen, die dem typischen „crimp-pattern“-Muster der Sehnen entsprechen. Die Zellen



haben zudem einen parallelen und geordneten Verlauf. Bei den Implantationen dieser Zelllinie wurde keine Osteoblastenentwicklung wahrgenommen.



**Abbildung 27:** Smad8 L+MH2/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches Gewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin). Der Schwamm lag subkutan vor. Vergrößerung 1:10, F = Fettgewebe, UG = Unterhautbindegewebe, durch Pfeile markiert = sehnen-ähnliches Gewebe

Es konnte gezeigt werden, dass durch Implantation von BMP2/Smad8 L+MH2-modifizierte mesenchymale Vorläuferzellen in C3H/HeN-Mäuse die Zellen in sehnenartiges Gewebe differenzierten.

Die Ergebnisse der Differenzierungsstudie und die Analysen der implantierten modifizierten C3H10T1/2-Zellen lieferten die Grundlage für weitere Untersuchungen in Hinblick auf die Entwicklung von Sehnenzellen. Um das Differenzierungspotential von primären mesenchymalen Stammzellen in Richtung Tendogenese weiter untersuchen zu können, wurden sowohl adenovirale als auch lentivirale Konstrukte hergestellt.

### 4.3 Adenoviren

Die in der Genregulation- und Genexpressionsforschung am häufigsten eingesetzten Adenoviren sind humane Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5) und Serotyp 2 (Ad2). Mit Hilfe des Adeno-X™ Expressionssystems von der Firma Clontech wurden die rekombinanten adenoviralen DNAs hergestellt. Im Anschluss wurden verschiedene Untersuchungen auf molekularer Ebene durchgeführt, um möglicherweise Aussagen über eventuelle Einflüsse der Konstrukte auf die Sehnendifferenzierung treffen zu können. Die zum Einsatz kommende Adeno-X-virale DNA ist eine Ad5 E1/E3-Deletionsmutante, die für rekombinante Adenoviren kodiert und die Zielzellen zwar infiziert, aber keine weiteren infektiösen Partikel freisetzt (siehe 3.5.1).

Folgende adenovirale Konstrukte wurden hergestellt:

- Smad8 Wildtyp (wt)
- Smad8 L+MH2
- BMP2

- konstitutiv-aktiver BMPR-IA Rezeptor (caBMPR-IA oder ca alk3)
- lac Z

Smad8 Wildtyp gehört zu den rezeptor-regulierten Smad-Proteinen (siehe Einleitung 1.6.3). Bei der konstitutiv aktiven Variante wurde die MH1-Domäne deletiert, so dass diese die MH2-Domäne nicht mehr hemmen kann. Dadurch ist das Protein konstitutiv aktiv, was durch vorherige Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe auch bestätigt werden konnte. Alle Smad-Proteine sind zusätzlich mit einem Flag-Epitop-Tag am N-Terminus versehen.

BMP2 (bone morphogenetic protein) gehört zu der TGF- $\beta$  Superfamilie und induziert in mesenchymalen Stammzellen unter anderem den osteogenen Signalweg. Es handelt sich um ein sekretiertes Protein.

Der konstitutiv-aktive BMPR-IA Rezeptor gehört zu der Gruppe der BMP Typ-I-Rezeptoren. Er wird auch als alk3 (activin-like kinase) bezeichnet. Der konstitutive BMP-Rezeptor sollte in einigen Versuchen als Ersatz für BMP2 eingesetzt werden, da dieser zwar ebenfalls das Signal weiterleitet, aber nicht wie das BMP2 sekretiert wird. Somit kann der caBMPR-IA keine parakrinen Effekte auslösen. Der Rezeptor wurde mit einem HA-Epitop-Tag versehen.

Das lacZ Gen kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Der Virus wird als Kontrollvirus eingesetzt.

#### 4.3.1 Klonierung der Zielgene in den pShuttle-Vektor

Die Zielgene wurden mit Restriktionsendonukleasen aus den pMT7T3-Vektoren geschnitten und nach Phenolisierung in einem LMP-Gel vom Vektor getrennt (siehe 3.1.4). Mittels High-Purification-Kit (siehe 3.1.5.1) wurden die cDNAs aus dem Gel gereinigt. Da der Vektor pShuttle (siehe Anhang) keine geeigneten Restriktionssites für eine direkte Klonierung aufwies, mussten die isolierten Inserts durch Klenow-Polymerasebehandlung mit sogenannten „blunt-ends“ („glatten Enden“) versehen werden (siehe 3.1.6). Nach Fällung wurde die Konzentration der `geblunteten` Inserts durch Vergleich mit Banden eines Längenmarkers auf einem Agarosegel bestimmt.

Das Zielgen wurde in die ebenfalls „gebluntete“ und mit Alkalischer Phosphatase dephosphorylierte MCS (multiple cloning site) des pShuttle-Vektors hineinkloniert und anschließend einem Doppelverdau unterzogen (Abbildung 28).

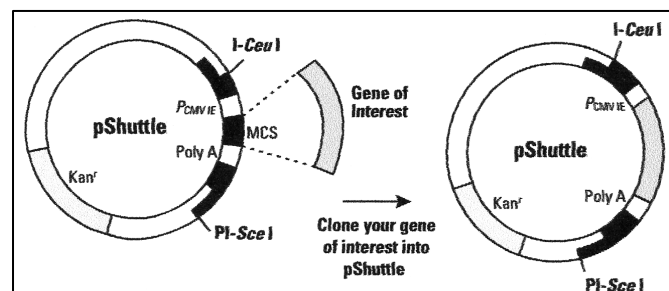


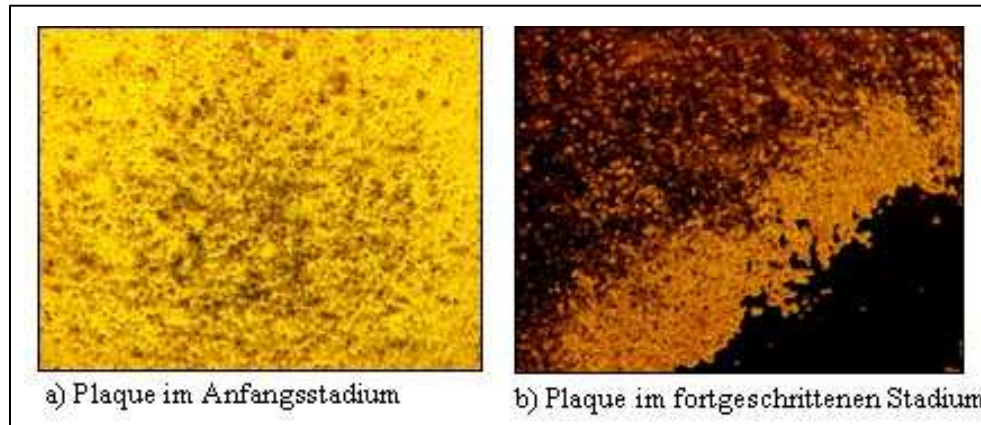
Abbildung 28: Klonierung des Zielgens in pShuttle.

Diese Expressionskassette wurde gemeinsam mit dem Adeno-X-Viral-DNA-Vektor *in vitro* ligiert und mit *Swa I* verdaut. Die *Swa I* ist zwischen der I-Ceu I und PI-Sce I-site in dem nicht-linearisierten Adeno-X-Vektor lokalisiert. Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *Swa I* wurden Vektoren ohne Fremdgen linearisiert und konnten in *E.coli* nicht mehr vermehrt werden (siehe 3.5.1.2).

#### 4.3.2 Entstehung von Plaques

Nach erfolgreicher Herstellung der DNA-Konstrukte wurden HEK 293 Low Passage (LP)-Zellen transfiziert und im Anschluss so lange weiterprozessiert, bis der gereinigte und getiterte Virus für weitere Versuche zur Verfügung stand.

Nach der Transfektion der Zellen konnte anhand der Bildung von Plaques erkannt werden, ob die Herstellung des Virus erfolgreich verlief. Am 7. Tag nach der Transfektion waren bei fast allen Konstrukten Plaques im Anfangsstadium zu erkennen (Abbildung 29 a), die sich in den nächsten Tagen ausbreiteten und die Nachbarzellen infizierten (Abbildung 29 b). Nach insgesamt 14 Tagen war der Zellrasen komplett lysiert, so dass dieser geerntet wurde und den ersten Virusstock darstellte, den sogenannten FTL (first transfection lysate).



**Abbildung 29:** Zellmorphologie nach adenoviraler Infektion. Der Zellrasen ist lysiert. Die dunklen Zellen sind bereits mit Virus infiziert. Vergrößerung 1:10

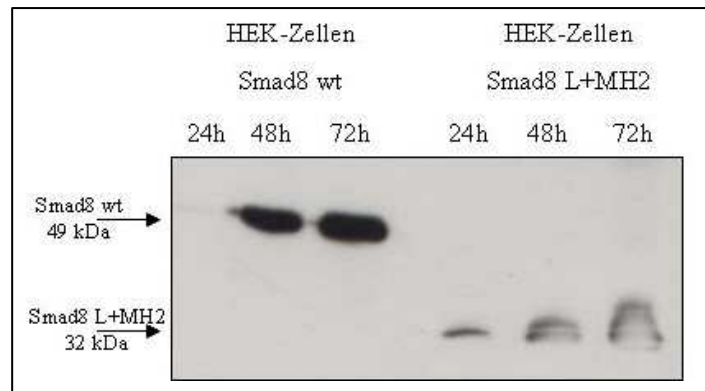
Mit dem jeweiligen FTL wurde zunächst eine Präinfektion ersten Grades durchgeführt (siehe 3.5.2.1), wodurch größere Mengen an Virus gewonnen wurden.

#### 4.3.3 Aufreinigung aller hergestellten Adenoviren

Um den Virustiter zu bestimmen, wurden die Adenoviren aufgereinigt. Dafür wurden diese in größeren Mengen produziert. Die Aufreinigung der Viren erfolgte über eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 3.5.3.3).

#### 4.3.4 Analyse der aufgereinigten Adenoviren Smad8 Wildtyp und Smad8 L+MH2 auf Proteinebene

Für die Analyse der aufgereinigten Virusstrukture auf Proteinebene wurden HEK 293 LP-Zellen infiziert und für drei Tage inkubiert. Nach jeweils 24 Stunden wurde eine Proteinprobe genommen und im Anschluss in einem Western Blot mit Hilfe eines Flag-Antikörpers detektiert (siehe 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3).



**Abbildung 30:** Proteinanalyse der adenovirus-abhängigen Synthese von Smad8 wt und Smad8 L+MH2 nach 24h, 48h und 72h in HEK 293 LP-Zellen. Nachweis durch Flag-Antikörper; Entwicklung mit ECL; Entwicklungszeit: 5 Minuten

Smad8 Wildtyp ist 49 kDa groß. Die Größe von Smad8 L+MH2 beträgt 32 kDa. Aus der Analyse geht hervor, dass die aufgereinigten Adenoviren in der Lage sind, diese Proteine zu synthetisieren. Bereits nach 24 Stunden ist eine deutliche Proteinbande zu erkennen, die im Verlauf der Proteinanalyse noch viel intensiver wird. Dabei ist die Proteinexpression von Smad8 Wildtyp höher als im Vergleich zu der konstitutiv aktiven Variante von Smad8 (Abbildung 30).

#### 4.3.5 Bestimmung des Titters der aufgereinigten Adenoviren

Die Bestimmung des Titters ist notwendig, um bei Differenzierungsstudien genau die Virusmenge einzusetzen, die für die Analysen am besten sind, um effizienten Gentransfer und eine hohe Lebenserwartung der Zellen zu gewährleisten. Für die Titrierung wurden HEK 293 LP-Zellen eingesetzt (siehe 3.5.4).

**Tabelle 5:** Titer der adenoviralen Isolate [Plaques bildende Einheiten/ml]

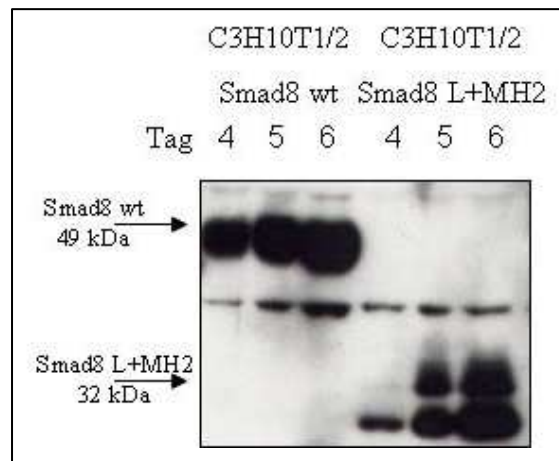
Adenovirus-Konstrukt	Titer [pfu/ml]
Smad8 Wildtyp	$0,75 \cdot 10^{12}$
Smad8 L+MH2	$0,5 \cdot 10^{12}$
caBMPR-IA	$2,5 \cdot 10^{13}$
BMP2	$1 \cdot 10^{11}$
lacZ	$1,5 \cdot 10^{11}$

Bei allen Versuchen, bei denen adenovirale Konstrukte zum Einsatz kamen, wurde mit den in der Tabelle 5 dargestellten Titerwerten gearbeitet.



#### 4.3.6 Proteinexpression der aufgereinigten Adenoviren in C3H10T1/2-Zellen

Um zu zeigen, dass die aufgereinigten Viruspartikel auch in mesenchymalen Stammzellen infektiös sind, wurden C3H10T1/2-Zellen ausgesät und mit einer MOI von 100 (multiplicity of infection 100) des jeweiligen Viruskonstruktes infiziert. Diese Angabe sagt aus, dass 100 infektiöse Viren auf eine mesenchymale Stammzelle treffen sollen. Die Verwendung der MOI 100 ist ein etablierter Standardwert bei Infektionen. An den Tagen 4, 5 und 6 nach Infektion wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe einer Western Blot Analyse auf ihre Proteinexpression hin untersucht (siehe 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3).



**Abbildung 31:** Analyse der adenoviralen Synthese von Smad8 wt und Smad8 L+MH2 nach der Virusaufreinigung. An den Tagen 4, 5 und 6 nach Infektion der C3H10T1/2-Zellen wurden die Proteine mittels Western Blot nachgewiesen. Spur 1–3: Nachweis von Smad8 wt, 49kDa. Spur 4–6: Nachweis von Smad8 L+MH2, 32kDa. Antikörper: Flag; Entwicklung mit ECL; Entwicklungszeit: 5 Minuten

Die Untersuchung der Proteinexpression zeigte, dass die aufgereinigten Adenoviren infektiös sind. Des Weiteren konnte mit dieser Analyse dargestellt werden, dass eine MOI von 100 ausreichend ist, um eine effiziente Synthese der Proteine zu erreichen (Abbildung 31).

#### 4.4 Differenzierungsstudie von adenoviral-infizierten C3H10T1/2-Zellen mit Smad8 L+MH2

Zur Heilung von gerissenen Sehnen und Bändern sollen Therapiemöglichkeiten mit primären mesenchymalen Stammzellen etabliert werden. Um die virale Infektiosität zu untersuchen und um zu prüfen, ob die konstitutiv aktive Variante von Smad8 *in vitro* einen Einfluss auf die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in die Sehnenrichtung hat, wurden zunächst die C3H10T1/2-Zellen mit verschiedenen Virenkombinationen infiziert und histologisch sowie molekularbiologisch untersucht. Es wurde eine Infektionskinetik mit vier Zeitpunkten durchgeführt (siehe 3.4.10).

Die nachfolgende Tabelle stellt eine Übersicht über die durchgeführten Kinetiken mit entsprechender Infektion der Zellen da.

**Tabelle 6:** Übersicht über die Differenzierungsstudien nach adenoviraler Infektion von C3H10T1/2-Zellen

<b>Zelllinie</b>	<b>Adenovirus-Konstrukt</b>	<b>MOI</b>
C3H10T1/2	Smad8 L+MH2	100
	BMP2	50
C3H10T1/2	Smad8 L+MH2	100
C3H10T1/2	Smad8 Wildtyp	100
	BMP2	50
C3H10T1/2	Smad8 Wildtyp	100
C3H10T1/2	lac Z	100

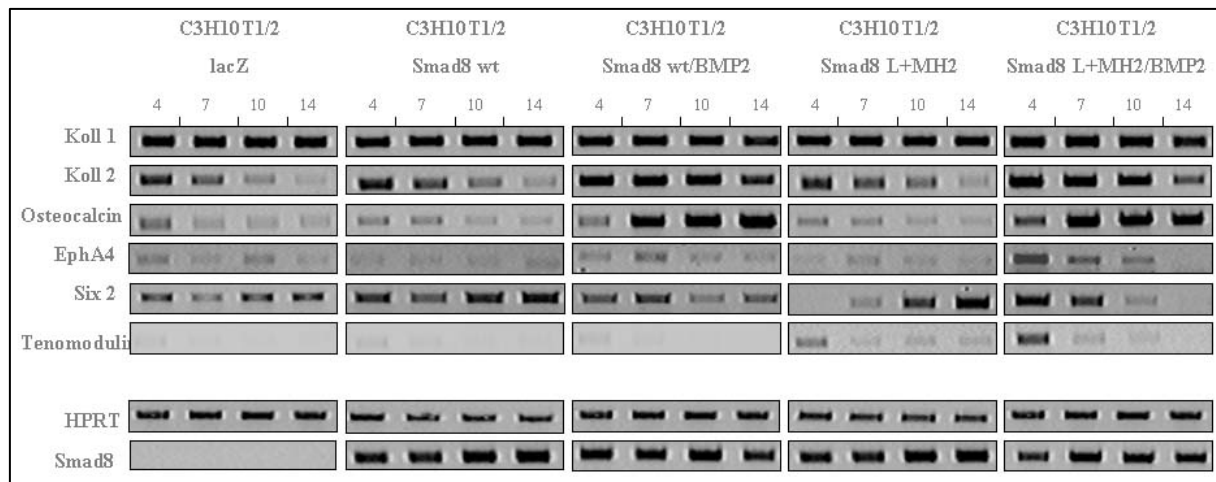
Wie aus der Tabelle 6 zu entnehmen ist, wurde bei den verschiedenen Viruskonstrukten mit unterschiedlichen MOIs gearbeitet. Da die Auswirkungen beziehungsweise der Einfluss von Smad8 auf die Sehnenentwicklung im Vordergrund stehen, wurde dieser Virus mit einer MOI von 100 eingesetzt. Bei dem BMP2-Virus wurde mit einer MOI von 50 gearbeitet. Als Kontrollvirus diente der  $\beta$ -Galactosidase-exprimierende lacZ Virus.

Um zu untersuchen, ob die Smad8 L+MH2-modifizierten mesenchymalen Stammzellen in Richtung Tendogenese differenzieren und sie die typische längliche Zellmorphologie aufweisen, wurden die Zellen an den zuvor festgelegten Zeitpunkten fixiert und im Anschluss mit Alkalischer Phosphatase (siehe 3.4.12.1) angefärbt. Leider zeigten die C3H10T1/2-Zellen dieser Färbungen keine auffälligen Morphologien (Daten nicht dargestellt). Um dennoch eine Aussage über einen stammzellabhängigen Einfluss von Smad8 L+MH2 auf die Sehnenentwicklung treffen zu können, wurde die Expression potentieller Bindegewebsmarker mittels RT-PCR-Analysen untersucht.

#### **4.4.1 Untersuchung der Expression von Markergenen der Bindegewebsentwicklung**

Wie bereits unter 4.1 beschrieben, wurden bis heute nur wenige Markergene beschrieben, die für die Charakterisierung der Tendogenese in Frage kommen. Zu den oben genannten putativen Markergenen, wurde in der Literatur ein weiteres Markergen beschrieben, dass *Tenomodulin* (Brandau et al., 2001). Es gehört zu den Typ-II-Transmembran-Glykoproteinen und wird vorwiegend in Sehnen, aber auch in Ligamenten und im Auge exprimiert.

Alle RT-PCRs (siehe 3.1.1) wurden bei Standardbedingungen mit einer Zykluszahl von 30 durchgeführt (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Expression von Markergenen während der Differenzierungsstudie mit adenoviral-modifizierten Zellen. C3H10T1/2-Zellen infiziert mit: 1. lacZ (Kontrolle), 2. Smad8 Wildtyp, 3. Smad8 Wildtyp und BMP2, 4. Smad8 L+MH2, 5. Smad8 L+MH2 und BMP2. Die RT-PCRs wurden mit den 1:10-Verdünnungen der jeweiligen cDNA durchgeführt (Ausnahme HPRT 1:100-Verdünnung).

Bei der Analyse der *Kollagen Typ I*-Expression konnte in keinen der infizierten Zellen Besonderheiten festgestellt werden. Die Kollagenexpression war ab dem 4. Tag sehr hoch und nahm über den gesamten Differenzierungszeitraum weder ab noch zu. Somit gab die Expression von *Kollagen Typ I* keinen Hinweis auf eine stattgefundene Sehnenentwicklung, stellt aber eine Voraussetzung für diese da.

Der Chondrozyten-Marker *Kollagen Typ II* wurde in den mesenchymalen Stammzellen ohne BMP2-Hintergrund an Tag 4 sehr stark exprimiert und nahm dann bis zum 14. Tag an Intensität ab. Bei den Zellen, die zusätzlich noch mit BMP2 infiziert wurden, war die Expression von *Kollagen Typ II* kontinuierlich hoch. Eine leichte Abnahme war am 14. Tag der Kinetik zu verzeichnen. Somit konnte hier gezeigt werden, dass wie erwartet eine BMP2-abhängige Differenzierung in Chondrozyten stattgefunden hat.

*Osteocalcin*, ein später Marker der Osteogenese, wurde in Abwesenheit von BMP2 sehr schwach exprimiert. Bei Anwesenheit von BMP2 fand ein rascher Anstieg der Expression statt, welcher sich bis zum Ende der Kinetik stetig erhöhte. Dieser Expressionsverlauf von *Osteocalcin* konnte aufgrund der BMP2-Sekretion in den C3H10T1/2-Zellen auf eine stattgefundene Osteogenese zurückgeführt werden.

*EphA4* wird in den distalen Sehnen der Extremitäten exprimiert. Bei Infektion von C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen konnte eine hohe Expression dieses putativen Markergens an Tag 4 wahrgenommen werden. Bis zum 10. Tag nahm die Expression von *EphA4* ab, am 14. Tag war keine Expression mehr zu erkennen. Bei den infizierten Zellen mit Smad8 Wildtyp und BMP2 war am 7. Tag eine leichte Erhöhung der Expression zu sehen. Alle anderen infizierten Zellen wiesen ein ähnliches Expressionsmuster wie die Kontrollzellen lacZ auf. Die erhöhte Expression von *EphA4* zu einem frühen Zeitpunkt in den C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen ließ vermuten, dass eine Differenzierung der Zellen in Richtung Tendogenese stattgefunden hat. Die Anwesenheit von BMP2 scheint die Smad8 L+MH2-abhängige Differenzierung zu Sehnenzellen zu unterstützen.

Der Transkriptionsfaktor *Six2* wird in sich entwickelnden Sehnen exprimiert. Zellen, die Smad8 Wildtyp enthielten zeigten, im Vergleich zu den Kontrollzellen, keine Unterschiede in der Expression von *Six2*. Bei den infizierten C3H10T1/2<sub>Smad8 L+MH2</sub>-Zellen kam es zu einem

kontinuierlichen Anstieg der *Six2* Expression während der Differenzierung. In Zellen, die zusätzlich zu Smad8 L+MH2 noch BMP2 enthielten, verlief die Expression von *Six2* genau entgegengesetzt. Bereits am 4. Tag war *Six2* sehr hoch exprimiert und nahm dann kontinuierlich ab. Auch hier erschien der Eindruck, dass eine stammzellabhängige Differenzierung von Smad8 L+MH2 in Sehnenrichtung stattgefunden hat und dass BMP2 den Effekt verstärkte.

*Tenomodulin* wird als ein wichtiger Marker der Bindegewebsentwicklung angesehen (Brandau et al., 2001). In den Zellen, die mit Smad8 Wildtyp infiziert wurden, kam es zu keiner nennenswerten Expression von *Tenomodulin*. Auch die Kombination von Smad8 Wildtyp mit BMP2 zeigte keine Veränderung des Expressionsmuster und war mit den Kontrollzellen gleichzusetzen. In den Zellen, die mit Smad8 L+MH2 allein als auch in Kombination mit BMP2 infiziert wurden, wurde *Tenomodulin* am Anfang der Differenzierung exprimiert. In Gegenwart von BMP2 war die Expressionsrate etwas höher. Bis zum 10. Tag nahm die Expression langsam ab. Somit zeigte das Expressionsverhalten von *Tenomodulin*, dass die Smad8 L+MH2-modifizierten mesenchymalen Stammzellen möglicherweise zu Sehnenzellen differenzieren können. Erneut verstärkte BMP2 den Effekt.

Interessante Expressionsverläufe der adenoviral-infizierten C3H10T1/2-Zellen zeigten die Markergene *EphA4*, *Six2* und *Tenomodulin*. Da diese Gene, vor allem *Tenomodulin*, mögliche Markergene für die Tendogenese darstellen, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass mit Hilfe der adenoviralen Vektoren eine stammzellabhängige Differenzierung in Sehnenzellen im Smad8 L+MH2-/BMP2-Hintergrund stattgefunden hat. Die *in vitro* gewonnenen Resultate sollten nun *in vivo* durch Implantation infizierter muriner mesenchymaler Stammzellen verifiziert werden.

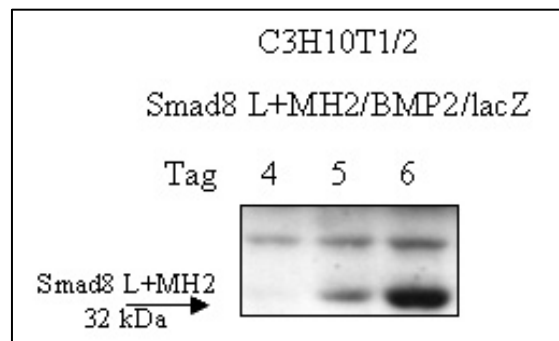
#### **4.5 Implantation von adenoviral-modifizierten murinen mesenchymalen Stammzellen (C3H10T1/2) in C3H/HeN-Mäuse**

Zur Prüfung der Differenzierungseigenschaften der adenoviralen Konstrukte *in vivo* und zum Vergleich des Differenzierungsverhaltens mit den rekombinanten Zelllinien wurden subkutane und intramuskuläre Implantationen von adenoviral-modifizierten C3H10T1/2-Zellen in C3H/HeN-Mäusen durchgeführt (siehe 3.7.1). In der Tabelle 7 sind die verschiedenen Kombinationen der Zellinfektionen dargestellt. Die eingesetzte Virusmenge für die jeweilige MOI wurde unter Berücksichtigung der in der Tabelle 5 angegebenen Titer errechnet.

**Tabelle 7:** Schema der Infektionen von C3H10T1/2-Zellen mit adenoviralen Konstrukten für ektopische Implantationen in C3H/HeN-Mäuse

Zellen	Adenoviren	MOI	Mäuse
C3H10T1/2	Smad8 L+MH2 BMP2 lacZ	100 50 10	C3H/HeN
C3H10T1/2	Smad8 L+MH2 lacZ	100 10	C3H/HeN
C3H10T1/2	Smad8 Wildtyp lacZ	100 10	C3H/HeN
C3H10T1/2	lacZ	10	C3H/HeN

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde vor der Implantation eine Western Blot Analyse durchgeführt (siehe 3.3.2 und 3.3.3). Der Proteinnachweis der Smad8 L+MH2-/BMP2-/lacZ-infizierten Zellen zeigte, dass das Protein Smad8 L+MH2 exprimiert wird. Die Expressionsrate stieg innerhalb des beobachteten Zeitraums stetig an (Abbildung 33).

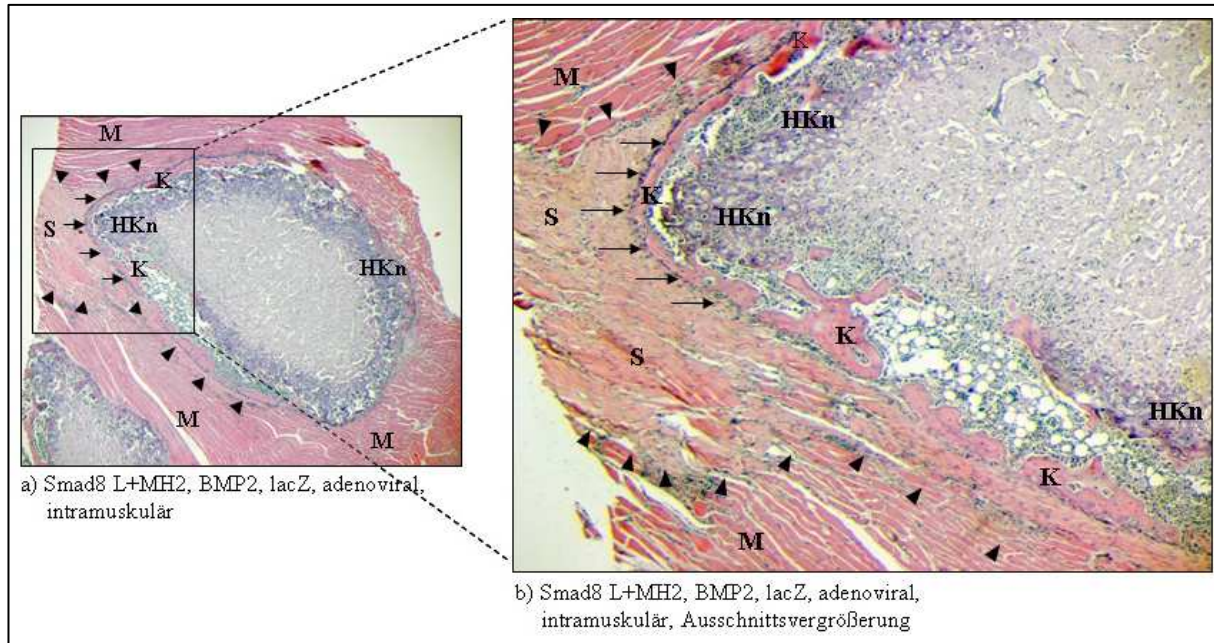


**Abbildung 33:** Nachweis der Proteinexpression von Smad8 L+MH2 nach adenoviraler Infektion in den implantierten Zellen mit Hilfe eines Flag-Antikörpers in einem Western Blot. Die Analyse erfolgte 4, 5 und 6 Tage nach Infektion. Entwicklung ECL plus, Entwicklungszeit: 30 Minuten

Die Implantationen erfolgten wie unter Abschnitt 4.2 beschrieben. Jede Maus erhielt einen mit modifizierten Zellen besiedelten subkutanen und intramuskulären Kollagenschwamm. Es wurden pro Infektionsansatz jeweils fünf Mäuse operiert. Nach vier Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und die Gewebeproben explantiert. Die Präparate wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von jeder Probe wurden auf drei unterschiedlichen Ebenen 3µm dicke Schnittpräparate angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin sowie Toluidin Blau angefärbt. Zum Nachweis von Mineralisierung eignete sich die Von Kossa-Färbung (siehe 3.7.3.4).

#### 4.5.1 Smad8 L+MH2-/BMP2-modifizierte murine mesenchymale Stammzellen bilden *in vivo* einen Knochen-Sehnen-Übergang (Entthese)

Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, werden bei der Hämatoxylin und Eosin Färbung (H+E) die Zellkerne und Zytoplasmaanteile blau-violett gefärbt. Eosin färbt die faserartigen extra-zellulären Komponenten rot. In der Abbildung 34 ist ein intramuskuläres Schnittpräparat mit Smad8 L+MH2- und BMP2-infizierten mesenchymalen Stammzellen nach einer solchen Färbung dargestellt.



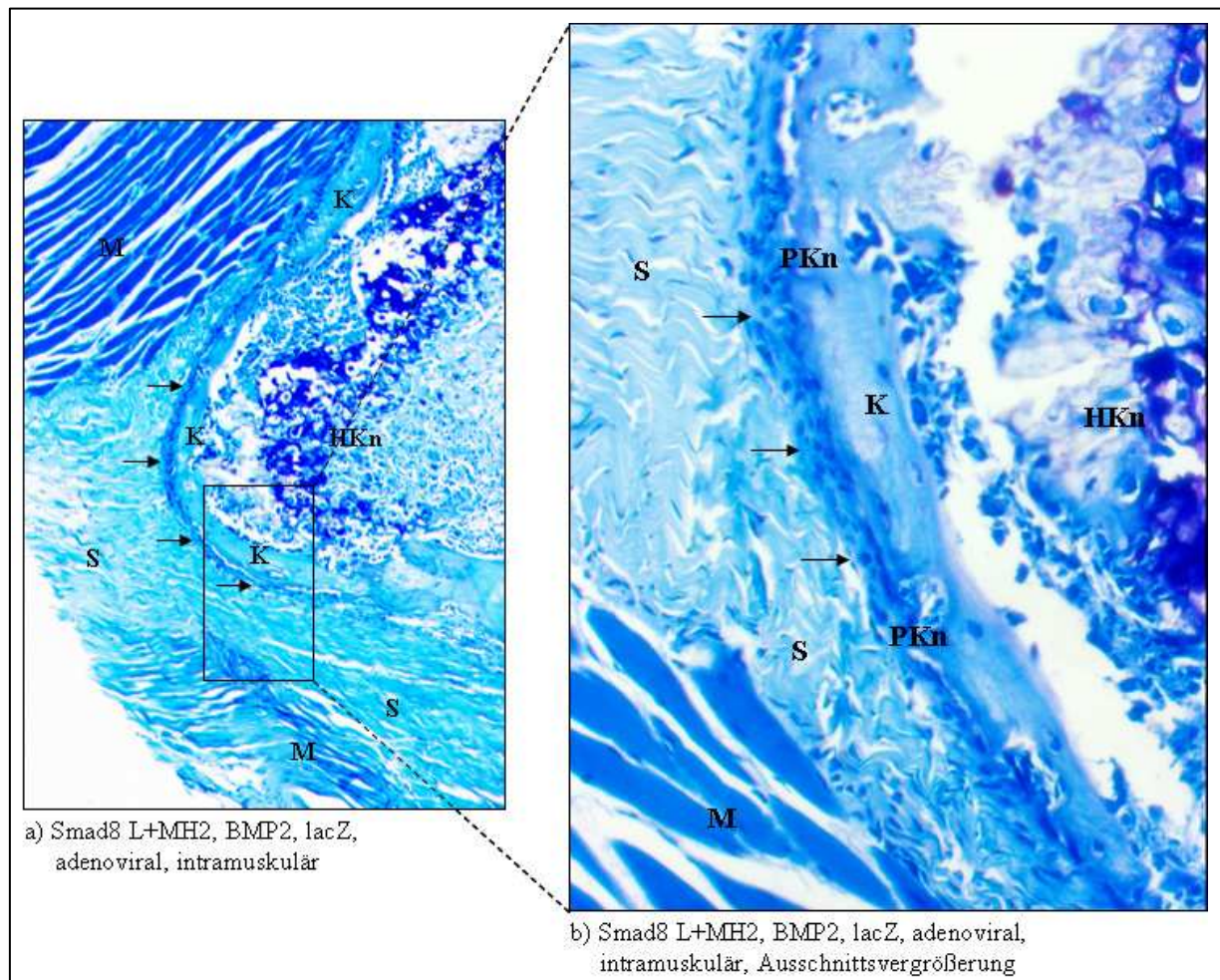
**Abbildung 34:** Smad8 L+MH2-/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches und Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin).

Bildung eines Knochen-Sehnen-Übergangs. Der Schwamm lag intramuskulär vor. S = Sehne, K = Knochen, M = Muskel, HKn = Hypertropher Knorpel; durch Dreiecke markierter Bereich = Sehne; durch Pfeile markierter Bereich = osteotendinous junction (Knochen-Sehnen-Übergang)

In der Abbildung 34 a) ist eine Übersicht von einem intramuskulären H+E-gefärbten Gewebepreparat abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Differenzierung der Zellen sowohl in Richtung Chondrogenese und Osteogenese als auch in die Richtung der Tendogenese stattgefunden hat. Die blau-violetten Strukturen in der Mitte des Präparates zeigen Knochen (K)- und Knorpelgewebe (HKn). Es sind Regionen mit hypertrophen Knorpel zu erkennen, die in mineralisiertes Knochengewebe übergehen. Interessant ist, dass genau an diesen Bereich rot-gefärbtes faserartiges Gewebe angrenzt, welches das typische wellenförmige Muster einer Sehne (S) aufweist. Ein Vergrößerungsausschnitt (Abbildung 34 b)) dieses Bereiches bestätigt die wellenförmige, sehnen-ähnliche Struktur. So eine Zone, in dem Knochengewebe in Sehnengewebe übergeht, wird als osteotendinous junction (OTJ, Knochen-Sehnen-Übergang, oder auch Entthese) bezeichnet. In der Abbildung 34 ist dieser Übergang durch schwarze Pfeile markiert. In diesem Fall könnte es sich um eine apophysäre Sehnenansatzzone handeln, da es so aussieht, als wenn sich am Knochen-Sehnen-Übergang Faserknorpel befindet. Es erfolgt ein allmählicher Übergang von straffem, parallelfaserigem kollagenen Bindegewebe über eine nicht mineralisierte Faserknorpelzone (mit zwischen die Bindegewebsfasern eingestreuten Knorpelzellen) zum Knochen.



Die Anfärbung eines weiteren Schnittpräparates mit Toluidin Blau (Abbildung 35 a) und b)) verdeutlicht die Bildung der mutmaßlichen apophysären Sehnenansatzzone. Diese Färbung ist spezifischer als die Hämatoxylin und Eosin-Färbung und färbt das Proteoglykan der Kollagenfasern hellblau.

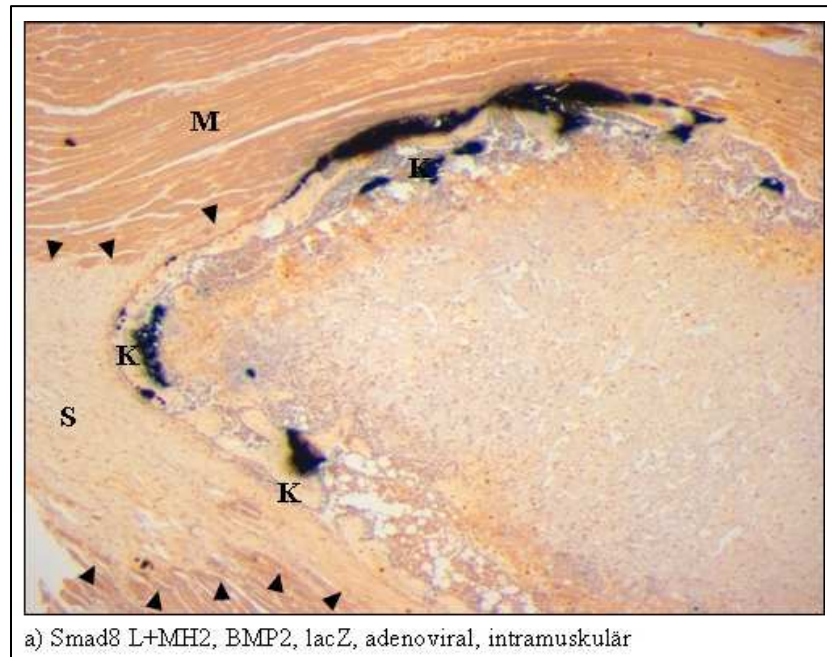


**Abbildung 35:** Smad8 L+MH2-/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches- und Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin Blau).

Bildung eines Knochen-Sehnen-Übergangs. Der Schwamm lag intramuskulär vor. S = Sehne, K = Knochen, M = Muskel, HKn = Hypertropher Knorpel, PKn = proliferierender Knorpel, durch Pfeile markierter Bereich = osteotendinous junction (Knochen-Sehnen-Übergang)

Durch diese Färbung konnte die Differenzierung der Zellen in die Richtungen Osteogenese, Chondrogenese und Tendogenese noch deutlicher erkannt werden. Die dunkelblau gefärbten Strukturen stellen den hypertrophen Knorpel (HKn) dar. Angrenzend an diesen Bereich befindet sich mineralisierter Knochen (K), der blassblau gefärbt ist. In der Vergrößerung (Abbildung 35 b)) ist deutlich zu erkennen, dass sich an die Region des mineralisierten Knochens eine Zone von proliferierenden Knorpelzellen (PKn) anschließt. Diese Zellen weisen eine wellenförmige Struktur auf und gehen in sehnen-ähnliches Gewebe über, welches deutlich anhand der wellenförmigen Strukturen zu erkennen ist. Der Knochen-Sehnen-Übergang konnte durch die Smad8 L+MH2-/ BMP2-abhängige Modifikation von murinen Stammzellen vollständig generiert werden.

In einem weiteren Schnittpräparat wurde mit Hilfe der Von Kossa-Färbung das mineralisierte Knochengewebe angefärbt. Dabei wird, wie in der Abbildung 36 zu erkennen ist, das Kalzium direkt in den Zellen durch eine dunkle Färbung nachgewiesen.



**Abbildung 36:** Smad8 L+MH2-/BMP2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in Knochengewebe nach ectopischer Implantation (Von Kossa).

Der Schwamm lag intramuskulär vor. S = Sehne, K = Knochen, M = Muskel, durch Dreiecke markierter Bereich = Sehne

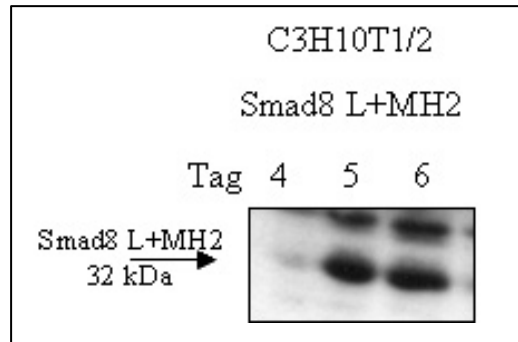
Mit Hilfe dieses Mausmodells zur subkutanen und intramuskulären Implantation von modifizierten C3H10T1/2-Zellen mit Smad8 L+MH2 und BMP2 in C3H/HeN-Mäuse konnte gezeigt werden, dass die adenoviral-modifizierten mesenchymalen Stammzellen in der Lage sind, ectopisch in Sehnengewebe zu differenzieren. Des Weiteren konnte ein Knochen-Sehnen-Übergang mit einer vermutlichen apophysären Sehnenansatzzone generiert werden. Die ectopische Bildung einer solchen Struktur wurde *in vivo* bisher noch nicht dokumentiert.

Um die Frage zu klären, ob BMP2 generell einen Einfluss auf die Bildung von Sehnengewebe hat oder ob Smad8 L+MH2 allein ausreicht, um die murinen mesenchymalen Stammzellen in Richtung Tendogenese differenzieren zu lassen, wurden weitere Implantationen mit adenoviral-modifizierten C3H10T1/2-Zellen durchgeführt.

#### **4.5.2 Smad8 L+MH2-modifizierte murine mesenchymale Stammzellen differenzieren in Sehnengewebe**

Bevor die Zellen in die Mäuse eingebracht wurden, erfolgte ein Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot Analyse (Abbildung 37). Das Smad-Protein wurde über sein Flag-Epitop nachgewiesen (siehe 3.3.2 und 3.3.3).

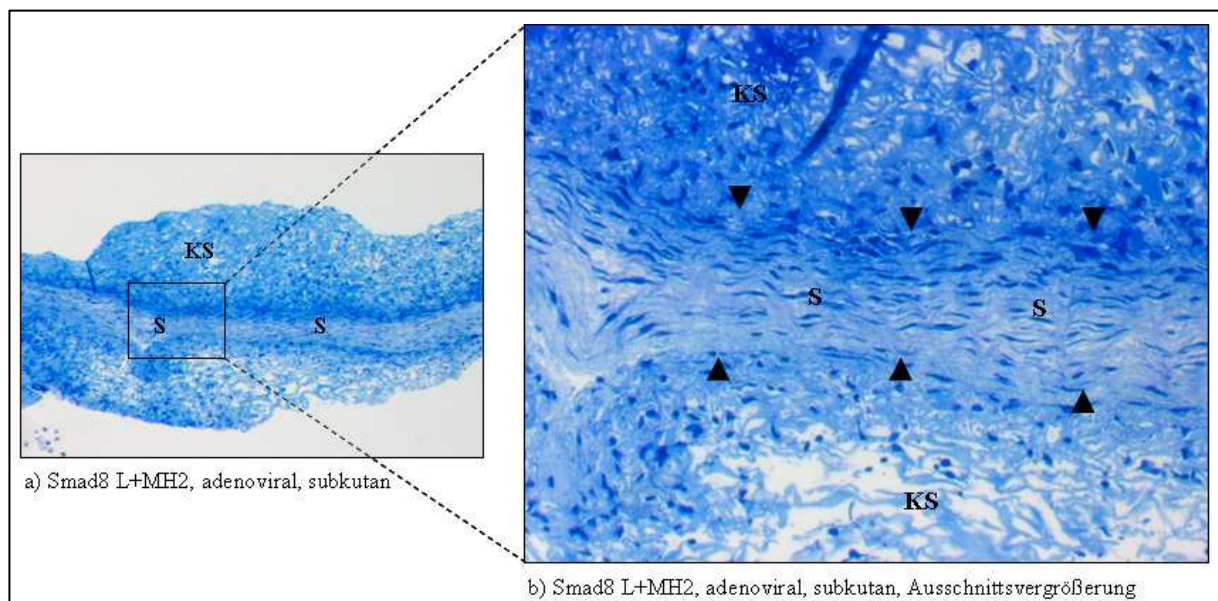




**Abbildung 37:** Nachweis der Proteinexpression von Smad8 L+MH2 in den zu implantierenden Zellen mit Hilfe eines Flag-Antikörpers in einem Western Blot. Die Analyse erfolgte 4, 5 und 6 Tage nach Infektion. Entwicklung: ECL plus, Entwicklungszeit: 30 Minuten

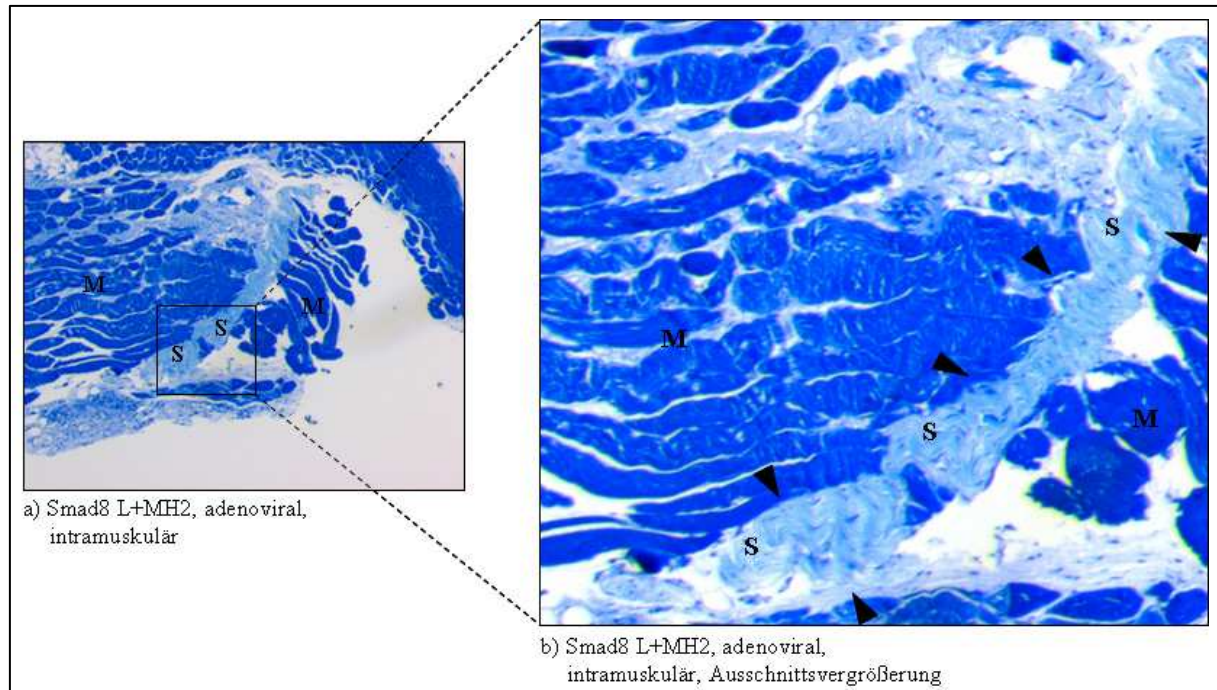
Die Expressionsbande verlief wie erwartet auf der Höhe von 32 kDa. Die zu implantierenden Zellen waren somit in der Lage, das Protein zu exprimieren.

Im Anschluss an die vierwöchige Implantationszeit erfolgte die Analyse der Präparate. Die intramuskulären Schwämme waren zum Teil mit dem umliegenden Mausegewebe verwachsen. Sowohl die subkutanen als auch die intramuskulären Explantate waren in ihrer Farbe weiß und besaßen eine elastische Struktur. Die Schwämme wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von jeder Gewebeprobe wurde auf drei unterschiedlichen Ebenen 3µm Schnittpräparate angefertigt. Es wurden Färbungen mit Toluidin Blau durchgeführt.



**Abbildung 38:** Smad8 L+MH2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnensähnliches Gewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin Blau). Der Schwamm lag subkutan vor. S = Sehne, KS = Kollagenschwamm, durch Dreiecke markierter Bereich = Sehne

Die Anfärbungen subkutaner (Abbildung 38) und intramuskulärer (Abbildung 39) Schnittpräparate zeigten Bereiche, in denen Zellen die typische Morphologie von Tenozyten aufwiesen. Die Zellkerne waren länglich und dünn und zeigten die charakteristische wellenförmige Struktur von Sehnenzellen. Der Verlauf dieser Zellen war gerichtet und parallel. Osteogene Strukturen konnten in keinem dieser Präparate entdeckt werden.



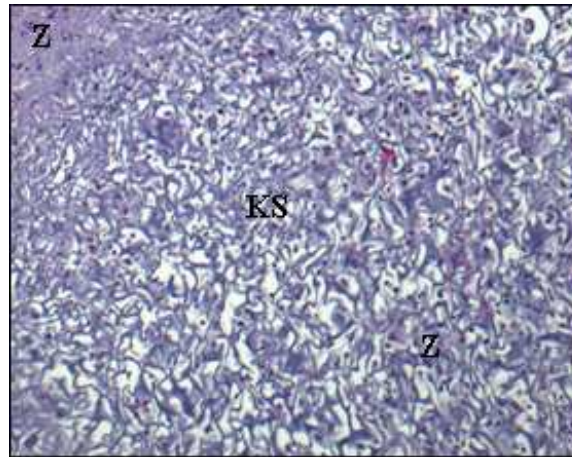
**Abbildung 39:** Smad8 L+MH2-abhängige Differenzierung der C3H10T1/2-Zellen in sehnen-ähnliches Gewebe nach ektopischer Implantation (Toluidin Blau). Der Schwamm lag intramuskulär vor. S = Sehne, M = Muskel, durch Dreiecke markierter Bereich = Sehne

#### 4.5.3 Smad8 Wildtyp-infizierte murine mesenchymale Stammzellen zeigen keine Differenzierung in Sehnengewebe

Wie aus der Analyse von bindegewebsspezifischen Markergenen ersichtlich wurde, hat die Wildtyp-Form von Smad8 keinen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen in die Sehnenrichtung. Um dieses Ergebnis *in vivo* zu bestätigen, wurden Implantationen von Smad8 Wildtyp-infizierten C3H10T1/2-Zellen durchgeführt. Die Implantationen und die Analysen erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben.

Bei der Explantation der Präparate wurden keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Konsistenz und der Farbe der Kollagenschwämme vermerkt. Sie waren weder besonders hart noch sehr elastisch.

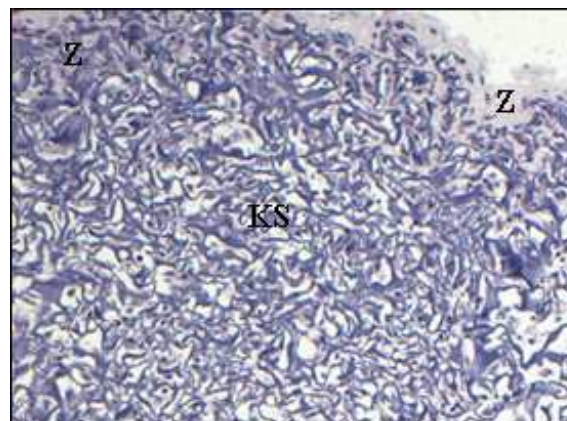
Die Anfärbungen der Schnittpräparate mit Hämatoxylin und Eosin zeigten keine auffälligen Morphologien (Abbildung 40). Es wurden überwiegend Schwammstrukturen gefunden. Die parentalen C3H10T1/2-Zellen waren nicht besonders angeordnet, sondern waren im ganzen Schwamm lokalisiert. Sie hatten weder eine lang gezogene noch wellenförmige Struktur, sondern besaßen die „normale“ rundliche Zellform. Es konnte somit keine Differenzierung der Smad8 Wildtyp-infizierten und implantierten murinen mesenchymalen Stammzellen in Richtung Tendogenese festgestellt werden.



**Abbildung 40:** Smad8 Wildtyp-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin). Smad8 Wildtyp-infizierte Zellen zeigen keine Differenzierung in Sehnengewebe. Der Schwamm lag subkutan vor. KS = Kollagenschwamm, Z = Zellen

#### 4.5.4 Kontrollvirus lacZ hat keinen Einfluss auf die Differenzierung in Sehnengewebe

Um auszuschließen, dass der Kontrollvirus lacZ einen Einfluss auf die Sehnenentwicklung ausübt, wurden C3H10T1/2-Zellen mit dem adenoviralen Konstrukt infiziert und wie zuvor implantiert. Die Analyse erfolgte durch eine Hämatoxylin und Eosin Färbung (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** LacZ-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin). Keine Differenzierung der implantierten lacZ-Zellen in Sehnengewebe. Der Schwamm lag subkutan vor. KS = Kollagenschwamm, Z = Zellen

Auch bei den Kontrollimplantationen mit lacZ-infizierten C3H10T1/2-Zellen konnten keine auffälligen Morphologien festgestellt werden. Die Zellen zeigten die typische Morphologie von C3H10T1/2-Zellen und können mit den Ergebnissen der implantierten Smad8 Wildtyp-Zellen verglichen werden.

Die Untersuchungen von implantierten mesenchymalen Stammzellen auf adenoviraler Ebene haben somit gezeigt, dass Smad8 L+MH2 und BMP2 gemeinsam in der Lage waren, die Differenzierung der Zellen in die Sehnenrichtung positiv zu beeinflussen. Des Weiteren wurde durch die Implantation der modifizierten mesenchymalen Stammzellen ein ektopischer Knochen-Sehnen-Übergang generiert. Es handelte sich dabei wahrscheinlich um eine apophysäre Sehnenansatzzone.

Zellen, die nur das Smad8 L+MH2 exprimierten, differenzierten ebenfalls in sehnens-ähnliche Zellen, wohingegen die implantierten Smad8 Wildtyp- C3H10T1/2-Zellen nicht in Richtung Tendogenese differenzierten.



Auffällig bei den adenoviral Smad8 L+MH2- und BMP2-infizierten Gewebeproben war, dass - im Vergleich zu den implantierten rekombinanten Zelllinien - die infizierten Zellen in zwei Richtungen differenzierten: Tendogenese und Osteogenese. Die rekombinanten Zelllinien zeigten dagegen im Smad8 L+MH2/BMP2-Hintergrund nur die Bildung von Sehnengewebe.

## 4.6 Lentiviren

Wesentliche Unterschiede zwischen den Adeno- und Lentiviren sind, dass Lentiviren sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen infizieren können. Die Lentiviren integrieren in die DNA, wohingegen die Adenoviren extrachromosomal bleiben. Daher sind Lentiviren für eine Gentherapie besser geeignet. Ein weiterer großer Vorteil von Lentiviren ist die schnellere Produktion, denn diese verkürzt sich um circa 2 1/2 Monate im Vergleich zu der Herstellung von Adenoviren. Zur Untersuchung der Sehnenentwicklung wurden daher auch rekombinante Lentiviren eingesetzt (siehe 3.6).

### 4.6.1 Implantation von modifizierten humanen mesenchymalen Stammzellen

Die Analyse der infizierten mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T1/2 mit den adenoviralen Konstrukten Smad8 L+MH2 und BMP2 haben gezeigt, dass diese Zellen in sehnens-ähnliches Gewebe und Knochen differenzierten. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob humane mesenchymale Stammzellen (huMSCs) bei Infektion mit lentiviralen Konstrukten unter gleichen Bedingungen ebenfalls in Richtung Tendogenese differenzieren können. Bei diesen Versuchen wurden Lentiviren mit einem pHRTK-Vektorkonstrukt (siehe Anhang) verwendet. Es handelt es sich um ein bicistronisches Vektorkonstrukt mit GFP (green fluorescent protein). Somit kann die Infektionseffizienz einige Tage nach der Lentivirusinfektion durch Untersuchung einer grünen Fluoreszenz der jeweiligen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden. Bei Lentiviren mit dem pHRTK-Vektor wird die Expression des eingebrachten Gens nicht reguliert, es kommt zu einer konstitutiven Transgenexpression.

Die pHRTK-Viren wurden von der Arbeitsgruppe Pierre Corbeau aus Montpellier (Frankreich) generiert. Die Tabelle 8 gibt den Titergehalt der Viren an.

**Tabelle 8:** Titer der lentiviralen Isolate [Plaque bildende Einheiten/ml]

<b>Lentivirus-konstrukt</b>	<b>Vektor</b>	<b>Titergehalt [pfu/ml]</b>
Smad8 L+MH2	pHRTK	$2,9 \cdot 10^8$
Smad8 Wildtyp	pHRTK	$1,5 \cdot 10^7$
BMP2	pHRTK	$1,9 \cdot 10^8$

Die huMSCs wurden von der Arbeitsgruppe Thomas Häupl von der Charité in Berlin zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Zellen von Patienten, die aus dem Knochenmark isoliert wurden.

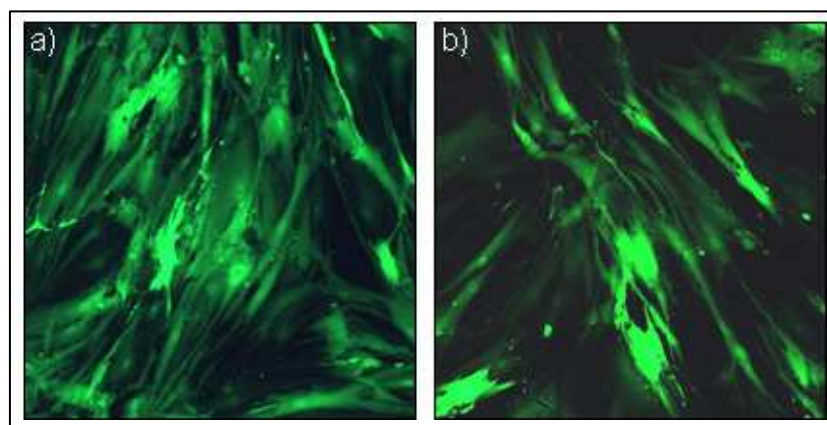
Für die Implantation von Stammzellen wurden weibliche athymische Nacktmäuse (nu/nu) verwendet. Da diese Tiere nicht immunkompetent sind, kommt es zu keiner graft-versus-host Reaktion.

Für eine stammzellabhängige Analyse von Smad8 L+MH2 in Hinsicht auf die Differenzierung in Sehnenzellen wurden Implantationsstudien mit verschiedenen Kombinationen von Lentiviren durchgeführt (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Infektionsschema der Zellen für Implantationsversuche

Zelllinie	Vektorkonstrukt	Virus MOI (multiplicity of infection)	Maus
huMSCs	pHRTK	Smad8 L+MH2 MOI 25 BMP2 MOI 25	nu/nu
huMSCs	pHRTK	BMP2 MOI 25	nu/nu
huMSCs	pHRTK	Smad8 Wildtyp MOI 25	nu/nu
huMSCs	-	uninfiziert	nu/nu

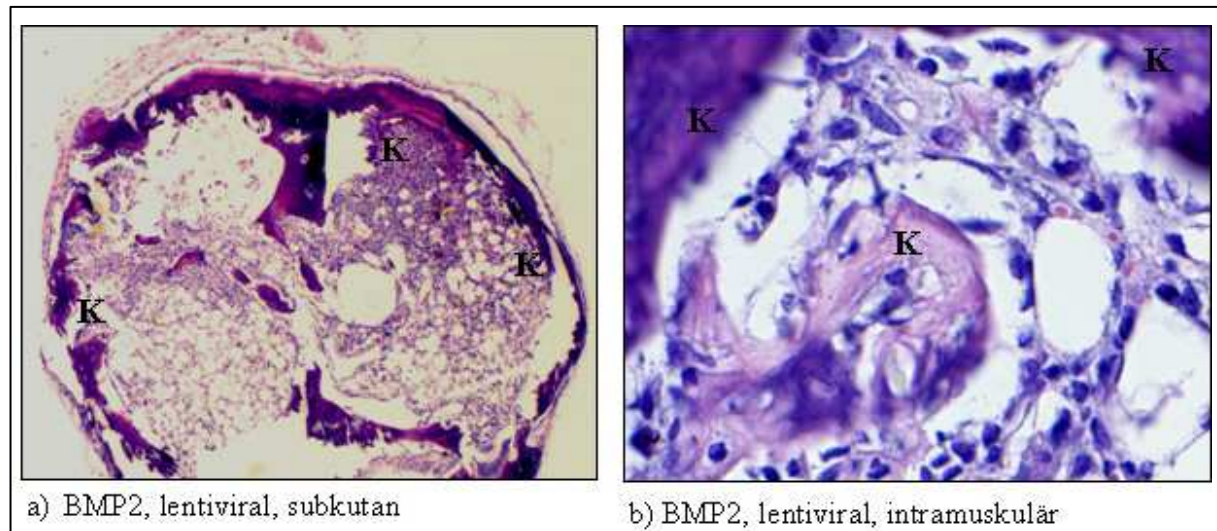
Bevor die Zellen in die Mäuse implantiert wurden, konnte aufgrund der Anwesenheit des GFP-Anteils die Infektionseffizienz überprüft werden. Diese lag vier Tage nach der Infektion bei nahezu 85%. In der Abbildung 42 a) sind die mit BMP2-Lentivirus und in Abbildung 42b) die Smad8 L+MH2- und BMP2-Lentivirus infizierten huMSCs dargestellt, die im Vordergrund stärker und im Hintergrund schwächer fluoreszierten.



**Abbildung 42:** HuMSC, die mit den Lentiviren a) BMP2, b) Smad8 L+MH2 und BMP2 infiziert wurden. Es handelt sich um Tag 4 nach Infektion. Diese Zellen wurden für die Implantationen verwendet. Vergrößerung 10x

#### 4.6.2 BMP2-infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren in Knochengewebe

Wie bei den vorherigen Implantationsexperimenten wurden auch hier nach Ablauf der vier Wochen die Präparate explantiert und analysiert. Der erste visuelle Eindruck zeigte ein verhärtetes Gewebe. Die Schwämme waren zum Teil mit dem umliegenden Mausegewebe verwachsen und besaßen kleine Blutgefäße (Daten nicht dargestellt).



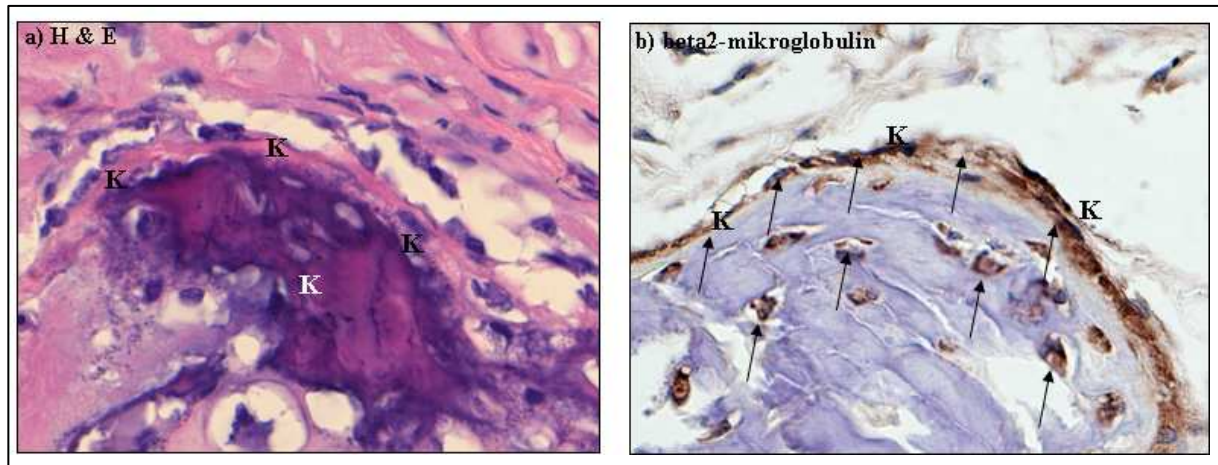
**Abbildung 43:** BMP2-abhängige Differenzierung der humanen MSCs in Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin). a) subkutan; b) intramuskulär. K = Knochen, zum Teil mineralisiert

Die in Abbildung 43 dargestellten Schnitte der Gewebeproben, die mit BMP2-infizierten humanen Stammzellen besiedelt und subkutan und intramuskulär implantiert wurden, zeigten eine komplette Verknöcherung des Implantates. Eine Übersichtsfotografie (Abbildung 43 a)) zeigt, dass es in der Mitte des Präparates zur Bildung von Knochenmark kam, welches von mineralisiertem Knochengewebe umgeben war. In der Abbildung 43 b) ist ein intramuskuläres Explantat dargestellt. Auch hier konnten die knöchernen Strukturen, die zum Teil schon mineralisiert waren, deutlich erkannt werden. Eine Differenzierung der Zellen in Sehnenrichtung in Gegenwart von BMP2 allein konnte nicht festgestellt werden und wurde auch nicht erwartet.

#### **4.6.2.1 Identifizierung der BMP2-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Gewebe mit Hilfe eines human-spezifischen $\beta 2$ -Mikroglobulin Antikörpers**

Um eine Gewissheit darüber zu bekommen, dass die eingebrachten humanen MSCs an der Entstehung des neu gebildeten Gewebes beteiligt waren, mussten die Zellen durch eine spezifische Färbung nachgewiesen werden.  $\beta 2$ -Mikroglobulin besitzt ein Molekulargewicht von 11,8 kD und besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 100 Aminosäuren. Es bildet die leichte Kette der HLA-I-Antigene, die - mit Ausnahme der Spermien - auf allen kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten gefunden werden. Somit können durch eine Anfärbung von  $\beta 2$ -Mikroglobulin die humanen Stammzellen nachgewiesen werden. Positive Zellen werden durch eine Braunfärbung detektiert (siehe 3.7.4.1).

Um die BMP2-infizierten und implantierten humanen mesenchymalen MSC im neu gebildeten Knochengewebe nachweisen zu können, wurden zwei aufeinander folgende Schnittpräparate mit Hämatoxylin und Eosin und mit einem  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Antikörper gefärbt. In der Abbildung 44 a) ist deutlich zu erkennen, dass es zur Bildung von Knochengewebe kam, welches zum Teil schon mineralisiert war. Durch Anfärbung von  $\beta 2$ -Mikroglobulin auf der Zelloberfläche der humanen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass sich die Osteozyten in dem Knochengewebe aus den humanen MSCs gebildet haben (Abbildung 44 b), schwarze Pfeile).



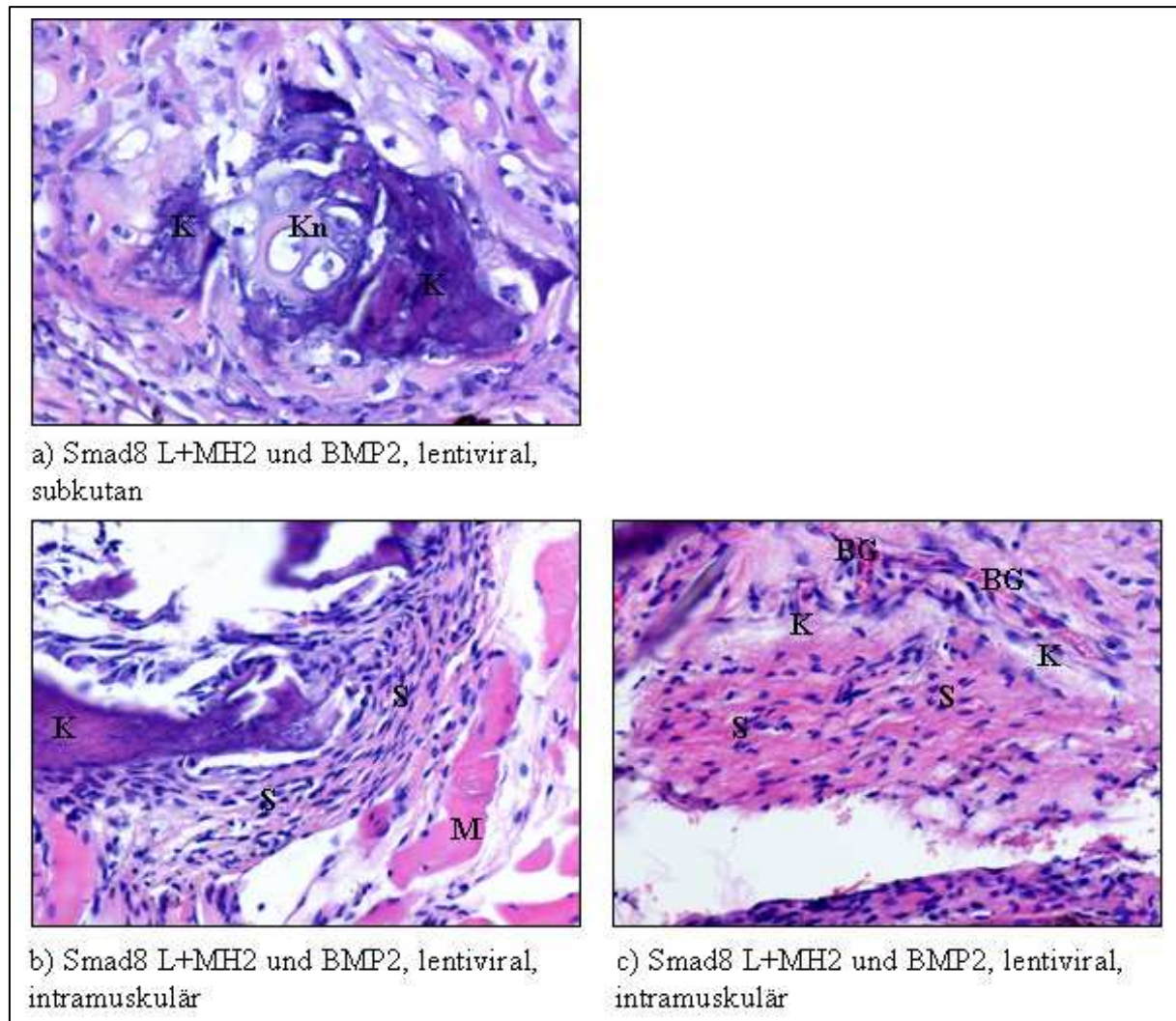
**Abbildung 44:** Nachweis der humanen MSCs im neu gebildeten Knochengewebe.

HuMSCs, die lentiviral mit BMP2-infiziert und intramuskulär implantiert wurden. a) Hämatoxylin und Eosin Färbung, b) humane  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörperfärbung. In der rechten Abbildung sind die humanen Stammzellen durch eine Braunfärbung zu erkennen (Pfeile). K = Knochen, Vergrößerung 1:40

#### **4.6.3 Smad8 L+MH2- und BMP2-infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren in sehnen-ähnliches Gewebe**

Auch hier wurden nach einer vierwöchigen Implantationszeit die Gewebeproben explantiert, die Präparate in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von jeder Gewebeprobe wurden auf drei unterschiedlichen Ebenen 3 $\mu$ m dicke Schnittpräparate angefertigt. Es wurde die Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin gewählt.





**Abbildung 45:** Smad8 L+MH2-/BMP2-abhängige Differenzierung der humanen MSCs in sehnen-ähnliches- und Knochengewebe nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin).

a) subkutan, b) und c) intramuskulär. K = Knochen, zum Teil mineralisiert; Kn = Knorpel, S = Sehne, M = Muskel, BG = Blutgefäße; Vergrößerung 1:20

In Abbildung 45 sind die subkutanen (a) und intramuskulären (b und c) Gewebeproben von 3 Mäusen mit lentiviral Smad8 L+MH2- und BMP2-infizierten humanen Stammzellen nach einer Hämatoxylin und Eosin Färbung dargestellt.

In dem subkutanen Implantat (a) konnte neben Strukturen des Kollagenschwammes überwiegend mineralisiertes Knochen (K)- und Knorpelgewebe (Kn) angefärbt werden.

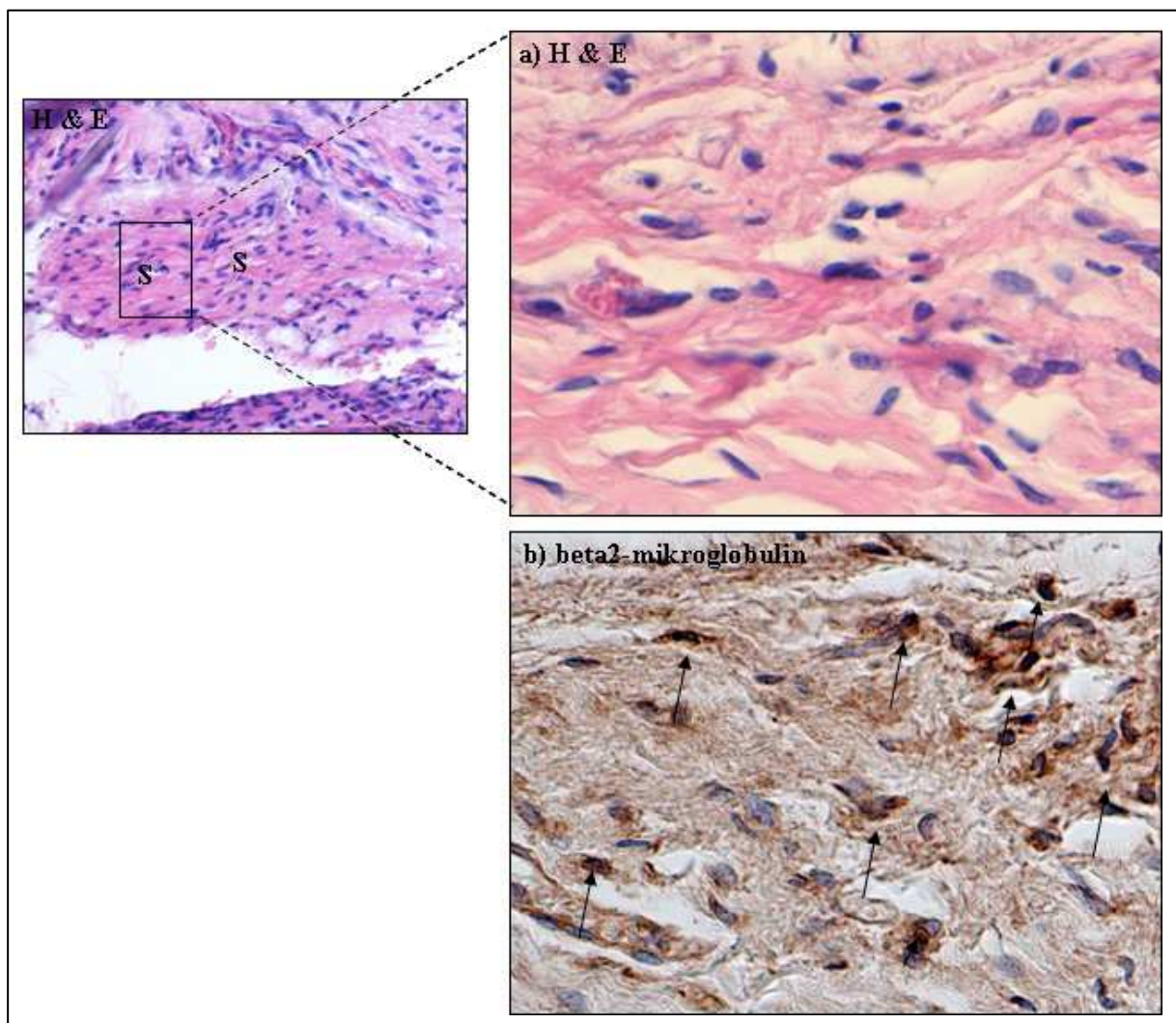
Die Gewebeprobe, die in 45 b) dargestellt ist, enthielt neben quergestreifter Muskulatur (M) und mineralisiertem Knochengewebe (K), zahlreiche fibroblastoide Zellen. Die Zellen bzw. die Zellkerne zeigten eine schmale, lang gezogene Struktur. Dieser Bereich wies den typisch gerichteten Faserverlauf eine Sehne (S) auf, der dazu noch leicht wellenförmig verlief. Besonders interessant war die Analyse des Präparates 45 c), denn in der Mitte konnte eine Struktur mit lang gestreckten schmalen Zellen, die von gerichteten Kollagenfasern umgeben waren, wahrgenommen werden. Es könnte sich um eine sehnen-ähnliche Struktur (S) handeln. Oberhalb der putativen Sehne war die beginnende Mineralisierung von Knochengewebe (K) und Blutgefäßbildung (BG) zu erkennen. Die Bildung von Knorpelgewebe konnte in diesem Präparat aber nicht beobachtet werden.



Somit konnte gezeigt werden, dass die Smad8 L+MH2- und BMP2-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen nach Implantation in Nacktmäuse in drei Richtungen differenzieren können: sehnen-ähnliches Gewebe, Knorpel- und Knochengewebe.

#### **4.6.3.1 Identifizierung der Smad8 L+MH2- und BMP2-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Gewebe mit Hilfe eines human-spezifischen $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörpers**

In Abschnitt 4.6.3 wurde bereits näher auf die Struktur des Schnittpräparates eingegangen, welches mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurde und die Differenzierung von Zellen in sehnen-ähnliches Gewebe darstellte (Abbildung 45 c)). Um zu prüfen, ob die implantierten und modifizierten huMSCs an der Bildung des sehnen-ähnlichen Gewebes beteiligt waren, wurde das darauf folgende Schnittpräparat mit dem human-spezifischen  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörper angefärbt und das Ergebnis mit der H+E Färbung verglichen.



**Abbildung 46:** Nachweis des neu gebildeten Sehnengewebes nach 4 wöchiger Implantationszeit, intramuskulär. HuMSCs, die lentiviral mit Smad8 L+MH2 und BMP2 infiziert wurden und mit a) Hämatoxylin und Eosin b)  $\beta$ 2-Mikroglobulin Antikörper angefärbt wurden. S = Sehne; Positive Zellen durch Pfeile markiert; Vergrößerung 1:40

In der Abbildung 46 (untere Abbildung) ist zu erkennen, dass auf vielen Stammzellen das  $\beta$ 2-Mikroglobulin angefärbt wurde, wodurch die Zellen dunkelbraun erschienen (Pfeile). Somit konnte durch diese Färbung gezeigt werden, dass die implantierten humanen mesenchymalen

Stammzellen an der Neubildung des sehnen-ähnlichen Gewebes beteiligt waren. Die bräunliche Anfärbung der Kollagenfasern war auf eine Hintergrundreaktion zurückzuführen.

Diese Implantationen haben somit gezeigt, dass auch humane mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, nach Infektion mit Smad8 L+MH2 und BMP2 in sehnen-ähnliches Gewebe zu differenzieren. Die Kontrollimplantationen mit dem Lentivirus Smad8 Wildtyp sowie mit uninfizierten huMSCs zeigten hingegen keine auffälligen morphologischen Erscheinungen (Daten nicht dargestellt). Die Ergebnisse dieser Implantationen ähneln somit mit den Resultaten der adenoviral-infizierten C3H10T1/2-Zellen und können mit diesen verglichen werden.

#### **4.7 Screening nach Faktoren, die in der Sehnenbildung eine Rolle spielen könnten**

In mehreren Veröffentlichungen wurde bereits gezeigt, dass die mesenchymale Vorläuferzelllinie C3H10T1/2 faktorabhängig in diverse Richtungen differenzieren kann. Wie in der Einleitung erwähnt, induziert BMP2 die Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Wie aus den gezeigten *in vitro* und *in vivo* Versuchen hervorgeht, ist die Zelllinie aber auch in der Lage, in Anwesenheit von Smad8 L+MH2 in die Sehnenzellrichtung zu differenzieren.

Aufgrund der Ergebnisse, dass die konstitutiv aktive Form von Smad8 in Gegenwart von BMP2 die Bildung von tendogenen Strukturen in C3H10T1/2-Zellen induzieren kann, war der nächste Schritt eine nähere Untersuchung dieser Zelllinie. Eine interessante Frage ist, welche Faktoren in dieser Zelllinie während der Differenzierung exprimiert werden. Das Augenmerk richtet sich dabei vor allem auf Faktoren, die zu einem frühen Zeitpunkt während der Differenzierung hochreguliert werden. Des Weiteren ist die geordnete Kollagenstruktur von Sehnen ein grundlegender Unterschied zu anderen Bindegeweben. Die Hypothese war daher, dass das Smad8 L+MH2/BMP2-Signalsystem für die Synthese von sekretierten Matrixkomponenten verantwortlich sein sollte, die ausreichend und notwendig für die Bildung der geordneten Kollagenstruktur in Sehnen sind. Aufgrund dieser Annahme wurde die Arbeitshypothese erstellt, dass sekretierte Faktoren die Schlüsselregulatoren für das tendogene Differenzierungsprogramm sein könnten. Das Ziel war daher, vor allem sekretierte Faktoren, die bei der Organisation der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen könnten, zu analysieren.

##### **4.7.1 Analyse des Genexpressionsprofils in C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen**

Zur Untersuchung des Genexpressionsprofils in den rekombinanten Zelllinien C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> wurden zwei zeitabhängige Kinetiken durchgeführt, um im Anschluss mittels einer Microarray Analyse Gene zu finden, die zu einem frühen Zeitpunkt während der Differenzierung zu Sehnenzellen reguliert werden. C3H10T1/2-Zellen, die nur einen BMP2-Hintergrund besitzen, differenzierten nicht zu Sehnengewebe (Abbildung 26). Zellen, die hingegen einen BMP2- und Smad8 L+MH2-Hintergrund besitzen, wiesen charakteristische Sehnenmerkmale auf (Abbildung 27). Um neue Gene zu finden, die einen Einfluss auf die Tendogenese haben könnten, wurde ein Vergleich der exprimierenden Gene von den beiden Zelllinien durchgeführt.

Für den Microarray wurde während der Kinetik an den Tagen 0, 7, 10 und 17 nach Konfluenz die Gesamt-RNA isoliert. Es folgte die Microarray Analyse, bei der diese RNAs eingesetzt wurden (siehe 3.7.5). Die Proben von Tag 0 wurden mit den Proben von den verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierungskinetik verglichen. Dabei erhielten die Gene an Tag 0 eine Expressionshöhe von 1.

Die eigentliche Auswertung der Daten beginnt mit der Analyse der vom Microarray-Scanner erstellten Bilder. Die Intensität eines jeden Spots muss bestimmt werden, um sie dann in numerische Werte umwandeln zu können. Um statistische Fehler (wie zum Beispiel

Hybridisierungslösung ungleichmäßig verteilt, unterschiedliche Halbwertszeiten der Farbstoffe) zu vermeiden, müssen die Werte normalisiert werden. Durch die Normalisierung werden die Ergebnisse bereinigt und die Daten können miteinander verglichen werden. Zur Identifizierung von Genen mit signifikanten Expressionsunterschieden, werden komplexe statistische Verfahren verwendet. Um verschiedene Muster in den Genexpressionsprofilen entdecken zu können, werden die Gene im Anschluss durch Cluster-Analysen in Gruppen (Cluster) zusammengefasst. Für diese Cluster-Analyse wurden im Vorfeld Kriterien festgelegt, nach denen die Gene geordnet werden sollten.

Die hoch- und herunterregulierten Gene wurden tabellarisch festgehalten. Im Folgenden wird nur ein kurzer Ausschnitt aus der Genliste gezeigt (Tabelle 10). Es handelt sich hierbei um sekretierte Faktoren.

**Tabelle 10:** Darstellung der Microarray Ergebnisse in Form einer Genliste. Vergleich der Regulationsmuster exprimierender Gene in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen. ID = Identification Number; Gene Title = falls zu der zugehörigen ID-Nummer bereits der Gennamen bekannt ist, wird dieser in der Liste angegeben; Cyto Map = funktionelle Aufgabe des Gens  
Rot = Gene, die zu diesem Zeitpunkt hochreguliert werden; Grün = Gene, die zu diesem Zeitpunkt herunterreguliert werden.

ID	Gene Title	Cyto Map	BMP2 d7	BMP2 d10	BMP2 d17	BMP2/ Smad8 L+MH2 d7	BMP2/ Smad8 L+MH2 d10	BMP2/ Smad8 L+MH2 d17
15044	<b>osteoblast specific factor 2 fascilin I-like (Periostin)</b>	-	11,59	1,02	0,85	28,50	19,49	17,99
7448	<b>partial sequence tetranectin</b>	no functional assignment	19,11	2,48	5,31	35,87	38,47	45,15
2987	<b>ribonuclease RNase A family 4</b>	RNase 4	1,05	1,68	1,17	5,75	9,58	14,15
807	<b>follistatin-like</b>	follistatin-related protein 1 precursor	1,84	0,49	0,37	3,22	5,00	2,97

Die Genliste bildete die Grundlage für die Auswahl eines sekretierten Faktors, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde und in der Organisation der extrazellulären Matrix eine mögliche Rolle spielen könnte.

Im Vergleich der Werte von BMP2/Smad8 L+MH2 mit BMP2 allein war deutlich zu erkennen, dass am 7. Tag die Gene Osteoblast specific factor 2 (Periostin) und Tetranektin stark hochreguliert wurden. Einige Faktoren wie beispielsweise Tetranektin und RNase4 wurden während der Differenzierung der Zellen kontinuierlich hochreguliert, andere hingegen nahmen nach anfänglicher Induktion in ihrer Expressionshöhe ab, so auch Osteoblast specific factor 2. Dieser Faktor wurde am Tag 7 (im Vergleich zu Tag 0) um das 28,5-fache durch BMP2/Smad8 L+MH2 hochreguliert. An den Tagen 10 und 17 wurde das Gen zwar immer noch stark exprimiert, hatte aber – im Vergleich zu Tag 7 – in der Expressionshöhe schon deutlich abgenommen. Die BMP2-vermittelte Expressionshöhe vom Osteoblast specific factor 2 hingegen lag deutlich niedriger.

Dieser Faktor sollte daher in weiteren Versuchen näher auf seinen Einfluss in der Sehnervenzellbildung untersucht werden.

Bei dem Osteoblast specific factor 2 handelt es sich um ein sekretiertes Protein mit einer Größe von 90kDa. Um eine Verwechslung mit dem Transkriptionsfaktor Cbfa1/Osf2 auszuschließen, wurde der Faktor in der Literatur umbenannt. Da er hauptsächlich im Periosteum (Knochenhaut) und im Periodontal Ligament (Zahnhaut) lokalisiert ist, erhielt er den Namen Periostin.

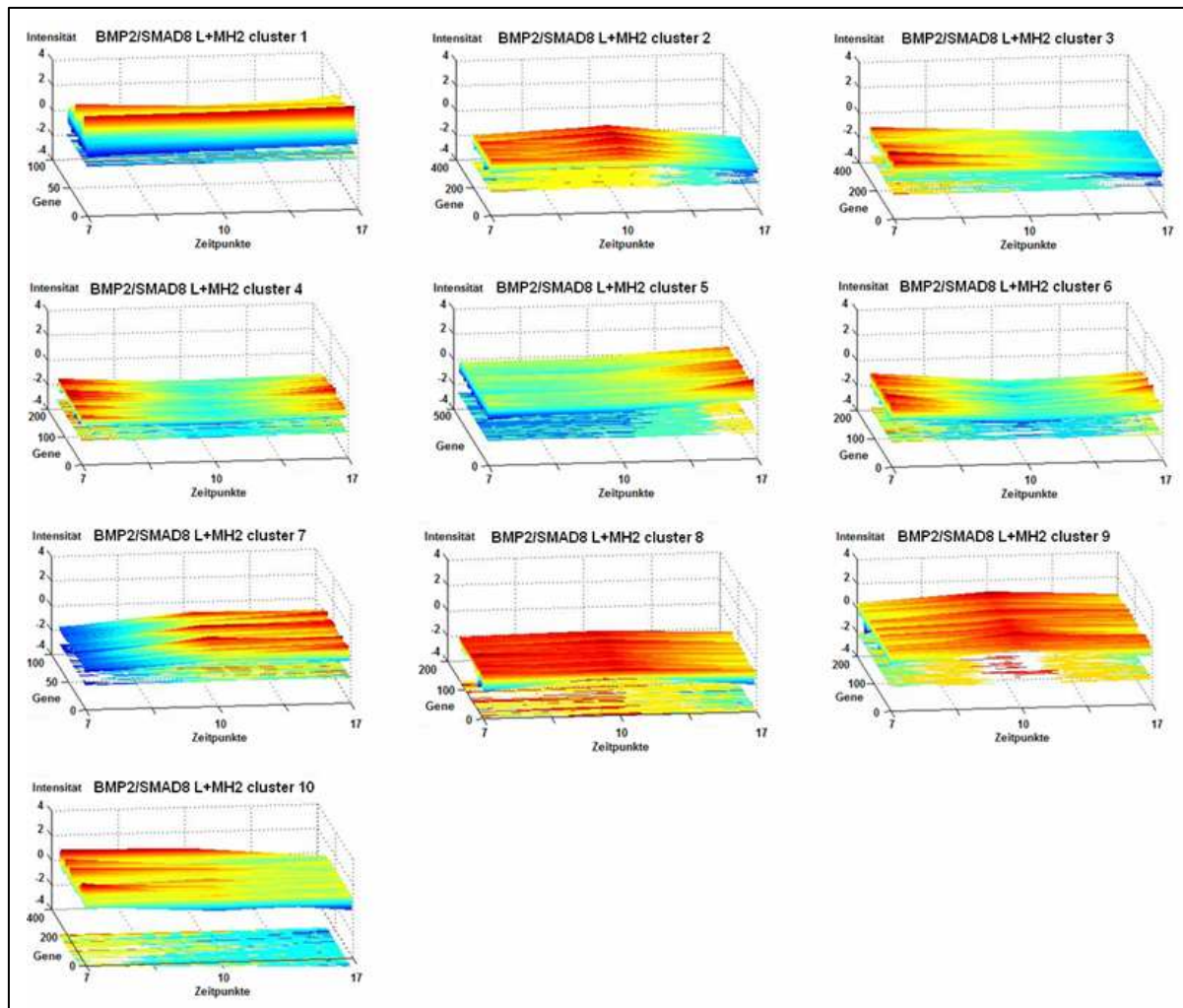
Die anderen sekretorischen Proteine Tetranektin, RNase 4 und Follistatin-like wurden in einer Diplomarbeit dieses Labors charakterisiert.

#### ***4.7.1.1 Anordnung der exprimierten Gene in C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen in Gen-Cluster***

Für die Einteilung der Gene in zehn verschiedene Gen-Cluster wurden im Vorfeld bestimmte Parameter festgelegt. Zu diesen gehörten die Intensität der Genexpression der einzelnen Gene zu Beginn der Differenzierung und der Verlauf der Expression während der Kinetik. Dadurch war es möglich, einzelne Gene mehreren Cluster zuzuordnen. Des Weiteren wurden die Expression der Gene gegen den Zeitpunkt Null der jeweiligen Zelllinie abgeglichen. Die grafischen Darstellungen zeigen somit die Expressionsaktivität einzelner Gene im Verlauf der Differenzierung, beginnend mit dem Tag Null (Abbildungen 47).

(Die Anordnung der exprimierten Gene in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen in Gencluster befindet sich im Anhang).

Bei der Smad8 L+MH2/BMP2-abhängigen Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen wurden insgesamt 1950 Gene differentiell exprimiert. Die Analyse hat gezeigt, dass von diesen Genen 997 Gene hochreguliert und 953 Gene herunterreguliert wurden. Die Einteilung der Gene erfolgte nach dem Prinzip wie unter 4.7.1. beschrieben. Die Cluster-Analyse der Gene lieferte folgende Ergebnisse:



**Abbildung 47:** Anordnung der in den C3H10T1/2BMP2/Smad8 L+MH2-exprimierenden Gene in Cluster. Grundlage für die Anordnung lieferte das ähnliche Expressionsprofil der Gene.

X-Achse = Zeitpunkt der Zellernte/RNA-Isolierung nach postkonfluenten Tagen in Kultur, Y-Achse = Expressionshöhe/Intensität der Gene, Z-Achse = Gene, die einem Cluster zugeordnet werden können  
 Rot = erhöhte Expression der Gene im Vergleich zu Tag 0; Gelb = Gleichbleiben der Expression; Türkis/Blau = Erniedrigung der Expression im Vergleich zu Tag 0

Im Folgenden werden einige Cluster exemplarisch erklärt:

#### 1. BMP2/Smad8 L+MH2 Cluster 1:

Unmittelbar nach Erreichen der Konfluenz werden die Gene verstärkt exprimiert und bleiben den ganzen Zeitraum oberhalb der Expressionshöhe von Tag 0. Allerdings nimmt ihre Expressionshöhe im Vergleich zum Tag 0 mehr oder weniger ab.

#### 2. BMP2/Smad8 L+MH2 Cluster 5:

In diesem Cluster nimmt die Expressionshöhe der Gene unmittelbar nach Erreichen der Konfluenz leicht ab. Ab dem Tag 10 erhöht sich die Expression wieder und geht über den Wert von Tag 0.

#### 3. BMP2/Smad8 L+MH2 Cluster 10:

Im Gegensatz zu Cluster 5 werden die Gene in diesem Cluster bereits am ersten Tag verstärkt exprimiert. Die Expressionshöhe nimmt anschließend stetig ab und nähert sich mehr oder weniger den Werten von Tag 0.



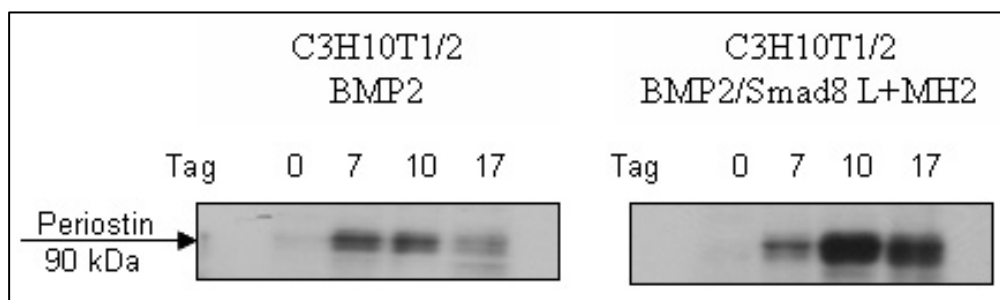
Das Protein Periostin entspricht dem Expressionsprofil der Gene im BMP2/Smad8 L+MH2 Cluster 1. Das Gen wird in dem BMP2/Smad8 L+MH2-Hintergrund früh hochreguliert und verliert im Verlauf der Differenzierung an Expressionshöhe, geht aber nicht unter den Wert von Tag 0 zurück.

#### 4.7.2 Verifizierung der Microarray-Daten

Um die Einflüsse des sekretierten Faktors Periostin auf die Sehnendifferenzierung in C3H10T1/2-Zellen zu analysieren, wurden zunächst die aus den Microarray gewonnenen Erkenntnisse in Hinsicht auf die Genexpression an den verschiedenen Zeitpunkten der Kinetik näher untersucht. Aufgrund der Microarray-Daten wurde erwartet, dass die Expression von Periostin in den C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene im Vergleich zu den BMP2-exprimierenden C3H10T1/2-Zellen induziert wird.

##### 4.7.2.1 Nachweis von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen auf Proteinebene mittels Western Blot

Um zu zeigen, dass die Proteinexpression von Periostin die Ergebnisse der Microarray-Analyse widerspiegelt, wurden an den Tagen 0, 7, 10 und 17 die Proteine aus den beiden Zelllinien C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub> isoliert und im Western Blot untersucht. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit einem Periostin-Antikörper der Firma Acris (siehe 3.3.2 und 3.3.3).

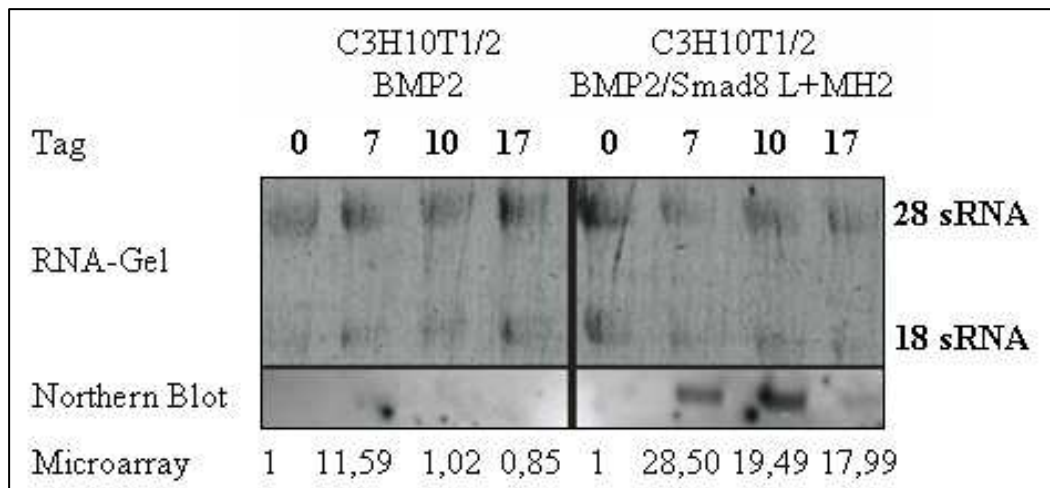


**Abbildung 48:** Nachweis der Proteinexpression von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen mittels Western Blot. Antikörper: Periostin; Entwicklung mit ECL; Entwicklungszeit 45 Min

Der Nachweis der Proteinexpression zeigte, dass in beiden Zelllinien das Protein Periostin exprimiert wird (Abbildung 48). Beim Vergleich des Western Blots mit den Ergebnissen der Microarray Analyse ist festzuhalten, dass die höchste Proteinexpression von Periostin in den C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen am Tag 10 erreicht wurde und nicht, wie im Microarray, an Tag 7. In den C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen war das Expressionsmaximum von Periostin zwar wie im Microarray an Tag 7 erreicht, nahm danach aber in der Expression langsamer ab.

##### 4.7.2.2 Nachweis von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen auf RNA-Ebene mittels Northern Blot

Der Nachweis von Periostin im Northern Blot erfolgte mit einer markierten DNA-Sonde (siehe 3.3.4). Um die Northern Blot Ergebnisse mit dem Daten des Microarrays vergleichen zu können, wurden die gleichen RNA-Proben wie bei den vorherigen Versuchen verwendet.



**Abbildung 49:** Northern Blot; Expression von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub><sup>-</sup> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub><sup>-</sup> Zellen an vier verschiedenen Zeitpunkten während einer Differenzierungsstudie.

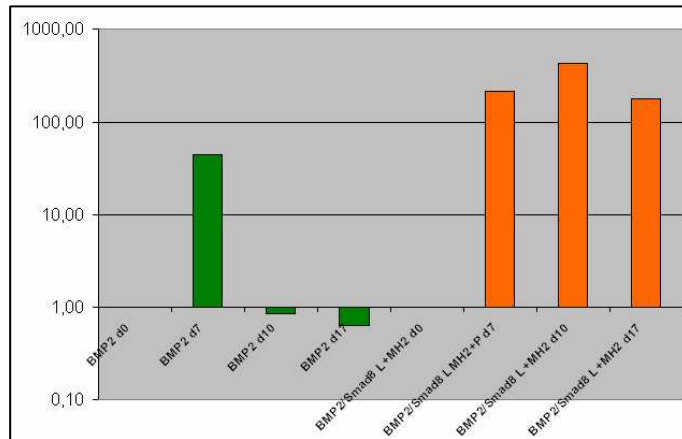
Die Ergebnisse des Northern Blots (Abbildung 49) zeigten, dass die Expression von Periostin auf RNA-Ebene in den BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen im Vergleich zu den BMP2-Zellen deutlich induziert wurde. Aber auch hier wurde Periostin in den BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen am Tag 10 der Differenzierung am höchsten exprimiert. Im Vergleich zu den Microarray-Daten erreichte Periostin am 7. Tag die höchste Expression. Diese Ergebnisse stimmten im Allgemeinen mit denen des Microarrays überein.

#### 4.7.2.3 Quantitativer Nachweis von Periostin in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen auf RNA-Ebene mittels Real-Time PCR

Für den quantitativen Nachweis von Periostin mittels Real-Time PCR (siehe 3.1.2) wurden die gleichen RNA-Proben der Differenzierungskinetiken von C3H10T1/2<sub>BMP2</sub> und C3H10T1/2<sub>BMP2/Smad8 L+MH2</sub>-Zellen verwendet, die bei der Microarray Analyse zum Einsatz gekommen sind. Nach der Isolierung der RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben. Es wurden Primerpaare konstruiert, die genau auf die Bedingungen für die Real-Time-PCR abgestimmt wurden (siehe Anhang).

Zunächst wurde das Expressionsmuster vom House-keeping gene HPRT in diesen Zellen bestimmt und die Werte abgeglichen. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Periostinexpression. Die Real-Time PCRs wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

**Tabelle 11:** Ergebnisse der Real-Time PCR vom HPRT-Abgleich und von der Periostin-Expression in C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup>-Zellen



	Absolute Periostin-Konz.	Absolute HPRT-Konz.	Relative Periostin-Konz.
BMP2 d0	7,14E+02	2,83E+04	1,00
BMP2 d7	3,04E+04	2,68E+04	44,96
BMP2 d10	2,42E+02	1,15E+04	0,83
BMP2 d17	3,23E+02	2,06E+04	0,62
BMP2/Smad8 L+MH2 d0	1,54E+03	7,59E+04	1,00
BMP2/Smad8 L+MH2 d7	2,45E+05	5,65E+04	213,72
BMP2/Smad8 L+MH2 d10	4,71E+05	5,41E+04	429,09
BMP2/Smad8 L+MH2 d17	1,53E+05	4,23E+04	178,27

**Abbildung 50:** Relative Periostin-Konzentration (RNA) in den C310T1/2<sup>BMP2</sup> (grün) und C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup>-Zellen (orange). Zum Vergleich mit den Microarray-Daten, wurden alle Werte gegen den Tag 0 abgeglichen, welcher den Wert 1 besaß.

Die durch die Real-Time PCR ermittelten Periostinwerte sollten mit den Daten der Microarray Analyse verglichen werden. Daher wurde in den Zelllinien C3H10T1/2<sup>BMP2</sup> und C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup> der Expressionswert von Periostin am Tag 0 mit 1 gleichgesetzt und die Werte der anderen Tagen dementsprechend angeglichen. Aus der Grafik (Abbildung 50) geht hervor, dass in den BMP2-Zellen die Periostinexpression an dem Tag 7 am höchsten ist und dann rasch abnimmt. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Microarray überein. In den BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen ist die Expression von Periostin am 7. Tag (ca. 210-fach im Vergleich zu Tag 0) der Differenzierung, im Vergleich zu den BMP2-Zellen (ca. 45-fach im Vergleich zu Tag 0), verstärkt. Das Maximum der Expression ist am 10. Tag (ca. 430-fach im Vergleich zu Tag 0) erreicht, danach nimmt sie langsam ab.

#### 4.8 Klonierung des sekretorischen Faktors Periostin zur Herstellung von Lentiviren

Nachdem die Ergebnisse des Microarrays durch verschiedene Methoden verifiziert werden konnten, sollte im nächsten Schritt die Auswirkung einer Überexpression von Periostin sowohl in den mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T1/2 als auch in humanen mesenchymalen Stammzellen (huMSCs) untersucht werden. Dazu wurde das Gen Periostin zunächst in den eukaryotischen Expressionsvektor pLox (siehe Anhang) kloniert. Es handelt sich dabei um einen Tetracyclin-abhängigen pLox-Virus. Aufgrund des MIK-Lentivirus, bestehend aus den Einheiten Transaktivator, IRES (internal ribosomal entry site) und Repressor, ist eine Regulation der Transgenexpression über das Tet-On-System möglich (siehe 3.6.4). Somit wurde der MIK-Virus aufgrund seiner Regulator-Funktion zu jedem Infektionsansatz hinzugefügt.

Die Klonierung erfolgte wie unter 3.1.13 beschrieben. Um die Genexpression nachweisen zu können, wurde das Protein mit einem HA-Epitop versehen. Wichtig war hierbei, dass das 3'-Ende mit dem Epitop versehen wurde und nicht das 5'-Ende. Bei Periostin handelt es sich um ein sekretiertes Protein. Alle sekretierten Faktoren haben an ihrem 5'-Ende eine Signalsequenz für die Sekretion. Würde diese zusammen mit dem HA-Epitop abgespalten werden oder mit der Sekretion interferieren, wäre ein Nachweis von Periostin über das Epitop nicht mehr möglich.



#### 4.8.1 Herstellung der Lentiviren

Im Anschluß an die Klonierung wurde der Lentivirus Periostin generiert (siehe 3.6.2). Neben dem Virus Periostin wurden noch weitere pLox-Lentiviren für die Untersuchungen benötigt.

Folgende Lentiviren wurden daher produziert:

- MIK
- GFP
- BMP-Rezeptor IA (ca alk3)
- BMP2
- Periostin

Die lentiviralen Konstrukte besitzen die gleichen Eigenschaften wie unter 4.3 beschrieben. GFP (green fluorescent protein) ist ein Protein, das erstmals in der Qualle *Aequorea victoria* beschrieben wurde und bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Durch die Kombination des GFP-Lentivirus mit anderen Lentiviren besteht die Möglichkeit, die Infektionseffizienz der Viren abzuschätzen.

#### 4.8.2 Bestimmung des Titergehaltes der Lentiviren

Nach der Herstellung der Lentiviren wurde der Titergehalt (Tabelle 12) mittels RT-PCR ermittelt (siehe 3.6.3). Die folgende Tabelle gibt die ermittelten Titerwerte wieder.

**Tabelle 12:** Titer der lentiviralen Isolate [Plaques bildende Einheiten/ml]

Lentivirus-konstrukt	Vektor	Titer [pfu/ $\mu$ l]
MIK	pLox	$8,6 \cdot 10^4$
GFP	pLox	$8,6 \cdot 10^4$
caBMPR-IA	pLox	$4,3 \cdot 10^5$
BMP2	pLox	$8,6 \cdot 10^4$
Periostin	pLox	$8,6 \cdot 10^4$

#### 4.9 Differenzierungsstudie mit lentiviral-infizierten C3H10T1/2-Zellen

Um die Eigenschaften des sekretierten Faktors Periostin in Hinsicht auf die Differenzierung von Zellen in Richtung Tendogenese zu analysieren, wurden C3H10T1/2-Zellen mit dem Lentivirus infiziert und deren Verhalten über einen festgelegten Zeitraum beobachtet (siehe 3.4.10). Folgende Infektionen der Zellen wurden vorgenommen (Tabelle 13):

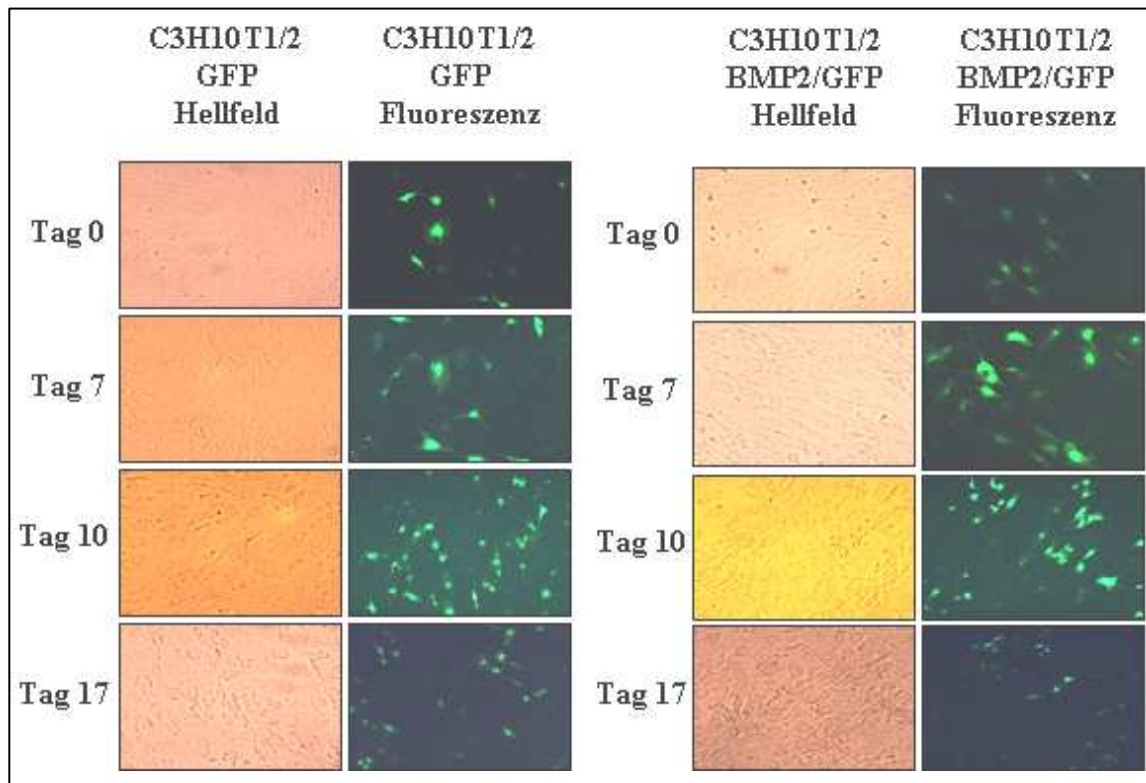
**Tabelle 13:** Infektion von C3H10T1/2-Zellen mit den Lentiviren GFP (Kontrolle), BMP2, Periostin und Periostin/BMP2

Zelllinie	Vektor	Virus MOI (multiplicity of infection)
C3H10T1/2	pLox	GFP MOI 50 MIK MOI 100
C3H10T1/2	pLox	BMP2 MOI 25 GFP MOI 50 MIK MOI 100
C3H10T1/2	pLox	Periostin MOI 25 MIK MOI 100
C3H10T1/2	pLox	Periostin MOI 25 BMP2 MOI 25 MIK MOI 100

Neben der Infektion von murinen mesenchymalen Stammzellen mit dem Lentivirus für die Periostinexpression wurde ebenfalls die Kombinationsinfektion von C3H10T1/2-Zellen mit Periostin und BMP2 vorgenommen. Diese Doppelinfektion erfolgte, da in vorherigen Untersuchungen ein Anstieg der Periostinexpression in den rekombinant BMP2 und Smad8 L+MH2 exprimierenden C3H10T1/2-Zellen nachgewiesen wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass Periostin für die Sehnenzellbindung den Faktor BMP2 benötigt. Diese zwei Versuchsansätze enthielten keinen GFP-Virus. Zur Kontrolle wurden C3H10T1/2-Zellen mit dem GFP-Virus allein und in Kombination mit dem Lentivirus BMP2 infiziert.

Es wurde eine Studie über 17 Tage durchgeführt. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, dass sie mit den Daten der Microarray-Analyse verglichen werden konnten.

Aufgrund der Fluoreszenzaktivität der GFP-infizierten Zellen konnte bereits nach einigen Tagen die Infektionseffizienz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops protokolliert werden. Diese lag im Durchschnitt bei 60 bis 65%, wobei einige Zellen die Konstrukte stärker, andere hingegen schwächer exprimiert haben (Abbildung 51).



**Abbildung 51:** Nachweis der Infektionseffizienz der Lentiviren anhand der Expression des eingebrachten GFP-Lentivirus. Links: Lentiviral-infizierte C3H10T1/2-Zellen mit GFP an den Tagen 0, 7, 10 und 17. Rechts: Lentiviral-infizierte C3H10T1/2-Zellen mit GFP und BMP2 an den Tagen 0, 7, 10 und 17. Aufnahmen jeweils im Hellfeld und im Fluoreszenzlicht mit einer Vergrößerung von 1:5.

Die Zellen wiesen zunächst keine morphologischen Besonderheiten in Hinsicht auf die Differenzierung in Sehnenzellen auf. Ein Unterschied zwischen den Kontrollzellen (nur GFP-infiziert) und den BMP2-/GFP-modifizierten Zellen wurde aber erwartet und war auch sichtbar. Die Zellen mit einem BMP2-Hintergrund waren kleiner und zeigten ein mehrschichtiges und dichteres Wachstum. Zum Ende der Kinetik bildeten sich viele Adipozyten.

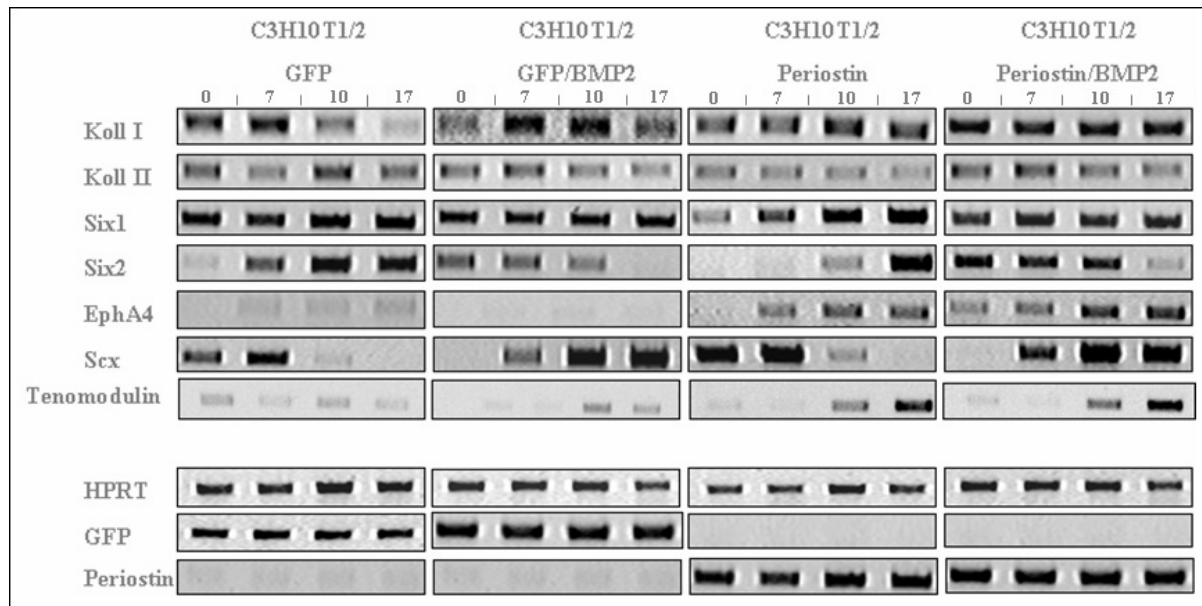
Die Anfärbung der Zellen mit Alkalischer Phosphatase ergab ebenfalls keine deutlichen Unterschiede. Lediglich der BMP2-Effekt war nachweisbar, denn in den Zellen mit BMP2-Hintergrund kam es zur Ausbildung von so genannten Nodules (Knoten). An diesen Stellen lagerten sich Zellen aus mehreren Richtungen kommend zusammen und bildeten eine dichte, mehrschichtige Zellschicht. Ebenfalls zeigten diese Zellen die typische sternförmige Osteoblastenmorphologie (Daten nicht dargestellt).

Die Periostin- und Periostin-/BMP2-modifizierten Zellen zeigten im Hellfeld-Mikroskop keine charakteristischen sehnen-ähnlichen Strukturen. Auch eine Anfärbung der modifizierten murinen Stammzellen mit Alkalischer Phosphatase wies keine tendogenen Besonderheiten auf (Daten nicht dargestellt).

Um dennoch einen möglichen Einfluss von Periostin auf die Sehnenentwicklung zu finden, wurde die RNA aus den Zellen der Differenzierungsstudie isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression potentieller Bindegewebsmarker mittels RT-PCR-Analysen untersucht.

#### 4.9.1 Untersuchungen der Expression von Markergenen der Bindegewebsentwicklung

Wie bereits unter 4.1 erwähnt, gibt es nur wenige potentielle Markergene für die Tendogenese. Im Folgenden wurden einige Gene untersucht, die einen Hinweis auf die Differenzierung in die Sehnenrichtung geben könnten (Abbildung 52).



**Abbildung 52:** Expression bestimmter Markergene während der Differenzierung lentiviral infizierter C3H10T1/2-Zellen mit 1) GFP, 2) GFP und BMP2, 3) Periostin und 4) Periostin und BMP2 an den Tagen 0, 7, 10 und 17. Die RT-PCRs wurden mit den jeweiligen 1:10 Verdünnungen durchgeführt. Ausnahme: HPRT 1:100 Verdünnung

Bei der Analyse von *Kollagen Typ I* konnte keine Besonderheit im Expressionsmuster in Hinsicht auf die Differenzierung zu Sehnenzellen festgestellt werden. Als Marker der Osteogenese wurde das Gen im BMP2-Hintergrund etwas verstärkt exprimiert. Bei den GFP-Kontrollzellen schien die *Kollagen Typ I* Expression zum Ende hin niedriger zu werden.

*Kollagen Typ II* wurde in den hier infizierten C3H10T1/2-Zellen kontinuierlich exprimiert. In Gegenwart von Periostin fiel die Expressionsrate, im Vergleich zu den Periostin-infizierten Zellen mit BMP2-Hintergrund, schwächer aus. Da *Kollagen Typ II* ein Marker für die Chondrogenese ist, war die erhöhte Expression auf BMP2 zurückzuführen. *Kollagen Typ II* wurde allerdings auch in den Kontrollzellen stark exprimiert.

Der Transkriptionsfaktor *Six1* zeigte in den Periostin-infizierten mesenchymalen Stammzellen eine stetige Zunahme der Expression. An Tag 0 der Kinetik war bereits eine Expression von *Six1* zu erkennen, die bis zum 17. Tag anstieg. In den anderen infizierten Zellen fand hingegen Expression auf einem gleich bleibend hohen Niveau statt.

Die Expression des Transkriptionsfaktors *Six2* zeigte in den Periostin-exprimierenden Zellen einen ähnlichen Verlauf wie in den Kontrollzellen. Bei Anwesenheit von BMP2 verlief die Expression genau gegenläufig. Somit kann die Expression von *Six2* keine Rückschlüsse auf die Differenzierung der Zellen in Sehnenrichtung geben.

Das Expressionsmuster der Rezeptor-Tyrosin-Kinase *EphA4* war besonders interessant. In den Kontrollzellen fand keine Expression von *EphA4* statt. In den Periostin- und Periostin-/BMP2-exprimierenden C3H10T1/2-Zellen hingegen wurde *EphA4* bereits an Tag 7 bzw. an Tag 0 exprimiert und nahm zum Tag 17 kontinuierlich zu, wobei die Expression in Gegenwart von BMP2 leicht verstärkt war. Da das putative Sehnenmarkergen *EphA4* nur in den Periostin-infizierten murinen mesenchymalen Stammzellen und nicht in den Kontrollzellen exprimiert wurde, könnte dies ein Hinweis auf eine Differenzierung in Richtung Tendogenese sein. Es scheint, dass BMP2 den Effekt verstärkt.

Die Expression von *Scleraxis* verlief in Anwesenheit von BMP2 gegenläufig im Vergleich zu den anderen infizierten Zellen. Die Expression von *Scleraxis* war in Gegenwart von Periostin leicht verstärkt. Da der Verlauf der Expression in den Kontrollzellen aber ähnlich war, kann somit ein Einfluss auf die Tendogenese nicht abgeleitet werden.

Das Transmembran-Glykoproteinen *Tenomodulin* wird vorwiegend in Sehnen exprimiert. In den mesenchymalen Stammzellen, die sowohl mit Periostin allein als auch mit Periostin und BMP2 infiziert wurden, fand eine Expression von *Tenomodulin* ab dem 10. Tag der Differenzierung statt und gewann bis zum 17. Tag an Expressionshöhe. In den Kontroll- und in den BMP2-Zellen war nur eine minimale *Tenomodulin*-Expression zu erkennen. Da *Tenomodulin* ein potentiell Markergen der Tendogenese darstellt, deuten die Ergebnisse der Expression auf eine stammzellabhängige Differenzierung in Sehnenzellen hin.

Einige bindegewebspezifische Markergene, vor allem *EphA4* und *Tenomodulin*, zeigten interessante Periostin-abhängige Expressionsmuster. Periostin könnte eventuell eine Rolle in der stammzellabhängigen Bildung von Sehnenzellen übernehmen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden im nächsten Schritt *in vivo* Versuche durchgeführt.

#### 4.10 Implantation von lentiviral-modifizierten murinen Stammzellen in Mäuse: C3H10T1/2-Zellen mit Periostin und Periostin/caBMPR-IA

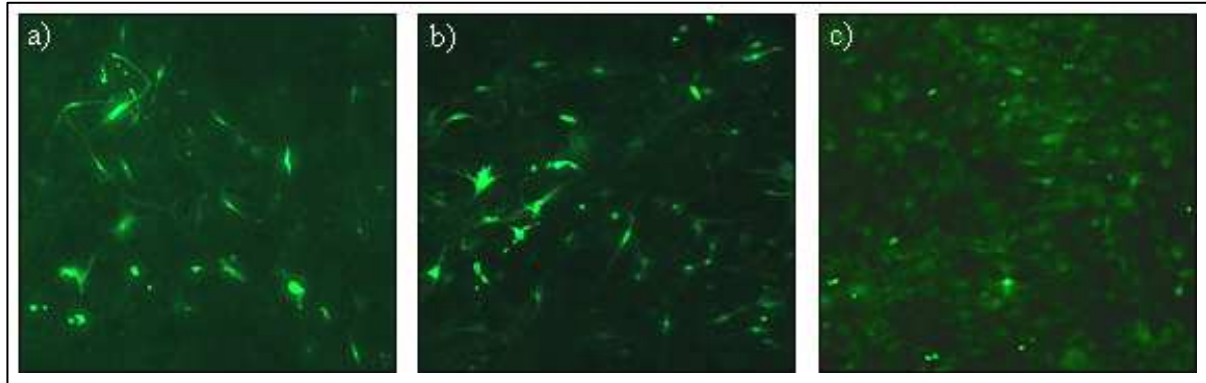
Für die Implantationen wurden die mesenchymalen Vorläuferzellen mit vier verschiedenen Viruskombinationen infiziert (Tabelle 14).

**Tabelle 14:** Infektionsschema der Zellen für Implantationsversuche

Zelllinie	Vektor	Virus MOI (multiplicity of infection)	Maus
C3H10T1/2	pLox	Periostin MOI 100 GFP MOI 100 MIK MOI 100	C3H/HeN
C3H10T1/2	pLox	Periostin MOI 100 caBMPR-IA MOI 100 GFP MOI 100 MIK MOI 100	C3H/HeN
C3H10T1/2	pLox	caBMPR-IA MOI 100 MIK MOI 100	C3H/HeN
C3H10T1/2	pLox	GFP MOI 100 MIK MOI 100	C3H/HeN

In diesen Versuchen wurde anstelle von BMP2 auf den konstitutiv aktiven BMP-Rezeptor-IA zurückgegriffen. Dieser Rezeptor vermittelt BMP-Signale, die im Gegensatz zu sekretiertem BMP2, nur in infizierten Zellen erfolgt. Da es sich bei den hier verwendeten Lentiviren um eine Tetracyclin-abhängige virale Expression handelte, wurde zur Regulierung der Genexpression den Mäusen das Antibiotikum Doxycyclin ins Trinkwasser gegeben.

Bevor die infizierten Zellen in die Mäuse implantiert wurden, konnte aufgrund des eingebrachten GFP-Lentivirus die Expressionseffizienz kontrolliert werden. Aus der Abbildung 53 ist zu entnehmen, dass die murinen mesenchymalen Stammzellen die Viren aufgenommen haben und eine Genexpression stattgefunden hat. Nach vier Tagen betrug die Infektionseffizienz der Zellen etwa 60 bis 65%, wobei einige Zellen das Konstrukt stärker, andere wiederum schwächer exprimiert haben. In der Illustration ist dies durch die starke Grünfärbung der murinen Stammzellen im Vordergrund und einer schwachen Färbung der Zellen im Hintergrund zu erkennen.

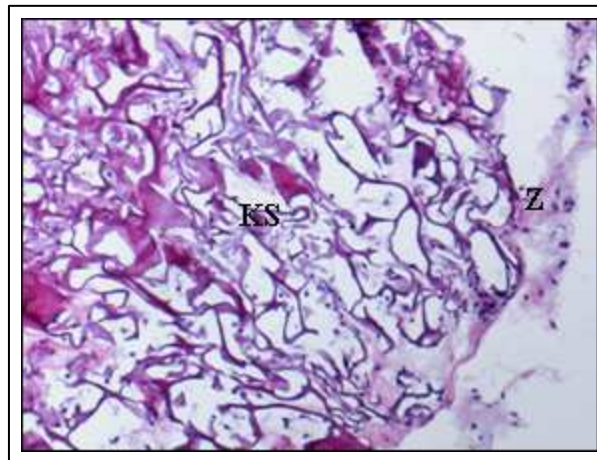


**Abbildung 53:** C3H10T1/2 lentiviral-infizierte Zellen mit a) Periostin und GFP b) Periostin, caBMPR-IA und GFP, c) GFP; Tag 4 nach Infektion. Diese Zellen wurden für die Implantationen verwendet. Vergrößerung 1:10

Nach Ablauf der Implantationszeit wurden die Mäuse euthanasiert und die Gewebestücke entnommen. Die Explantate mit Periostin- und Periostin-/BMP2-infizierten murinen Stammzellen hatten eine weiche, elastische Konsistenz. Die Präparate wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von jeder Gewebeprobe wurde auf drei unterschiedliche Stufen jeweils ein Hämatoxylin und Eosin Schnittpräparat von 3µm Dicke angefertigt.

#### 4.10.1 Der Kontrollvirus GFP und der Lentivirus caBMPR-IA üben keinen Einfluss auf die Differenzierung in Sehnengewebe aus

Zur Kontrolle, ob der GFP-Virus einen Einfluss auf die Differenzierung der murinen mesenchymalen Stammzellen ausübte, wurden Implantationen unter den gleichen Bedingungen wie bei den folgenden Implantationen durchgeführt. Es wurden fünf intramuskuläre und fünf subkutane Implantationen mit GFP-infizierten C3H10T1/2- Zellen vorgenommen. Bei der Explantation der Kollagenschwämme konnten keine Besonderheiten in Bezug auf die Beschaffenheit der Konsistenz und der Farbe festgestellt werden. Die Analyse der Kollagenschwämme erfolgte durch Hämatoxylin und Eosin-Färbungen. In den analysierten subkutanen und intramuskulären Gewebeproben mit GFP-infizierten C3H10T1/2-Zellen konnten keine Auffälligkeiten erkannt werden (Abbildung 54).

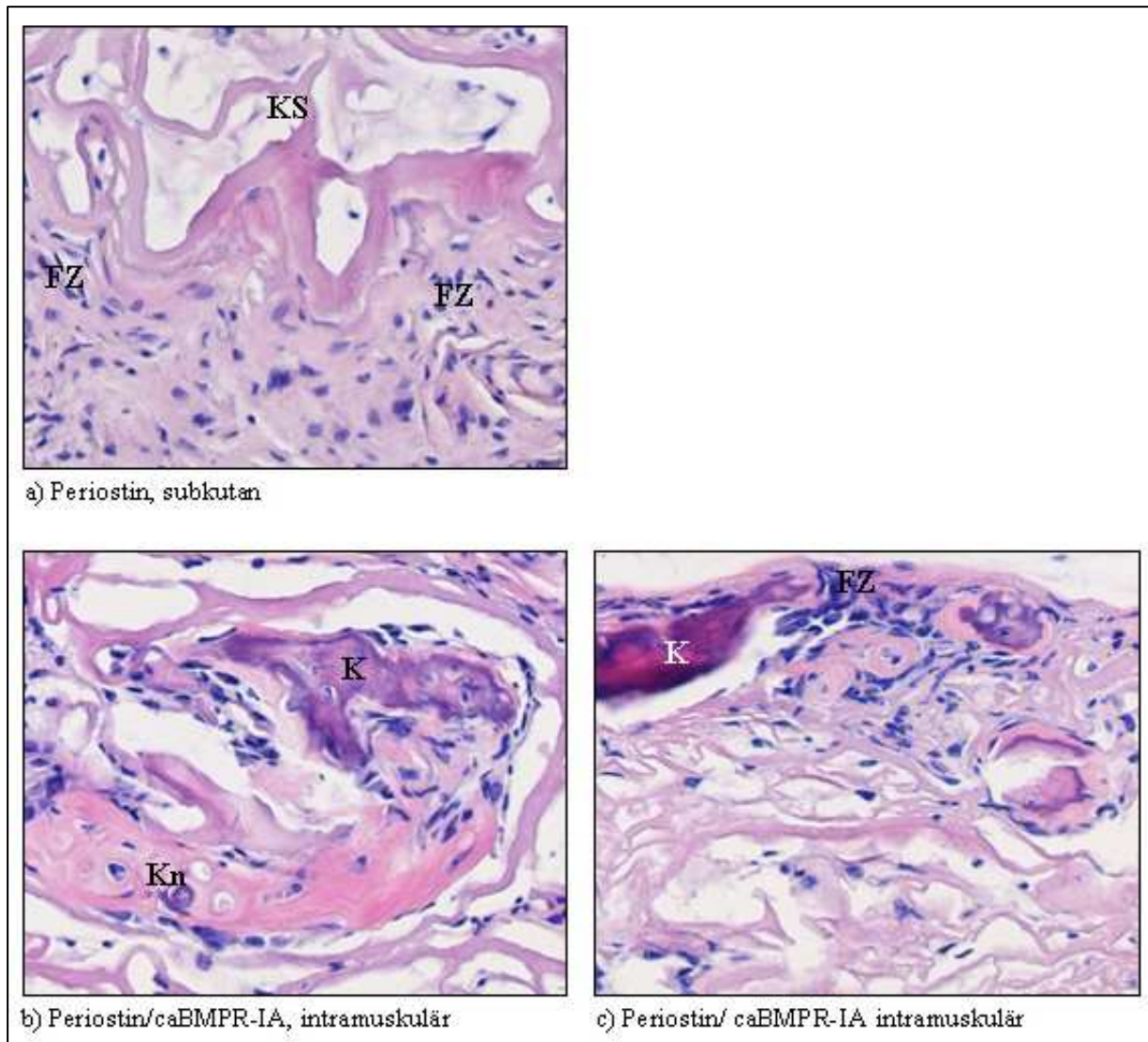


**Abbildung 54:** GFP-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin). Keine Differenzierung der Zellen in eine bestimmte Richtung. Der Schwamm lag subkutan vor. Schnittdicke = 3µm; Vergrößerung 1:10, KS = Kollagenschwamm, Z = Zellen

Die Zellen besaßen die typische morphologische Struktur von C3H10T1/2-Zellen und waren im ganzen Schwamm verteilt. Es fand keine auffällige Differenzierung der Zellen in eine bestimmte Richtung statt. Somit konnte gezeigt werden, dass der GFP-Lentivirus keinen Einfluss auf die Differenzierung in die Sehnen-, Knorpel- und Knochenrichtung hatte. Wie erwartet, differenzierten die caBMPR-IA infizierten und implantierten C3H10T1/2-Zellen in Knorpelgewebe (Daten nicht gezeigt). Hinweise auf eine Differenzierung in sehnen-ähnliches Gewebe fehlten auch hier.



#### 4.10.2 Periostin- und Periostin/caBMPR-IA- infizierte murine mesenchymale Stammzellen differenzieren in sehnen-ähnliches Gewebe



**Abbildung 55:** Periostin/caBMPR-IA-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin).

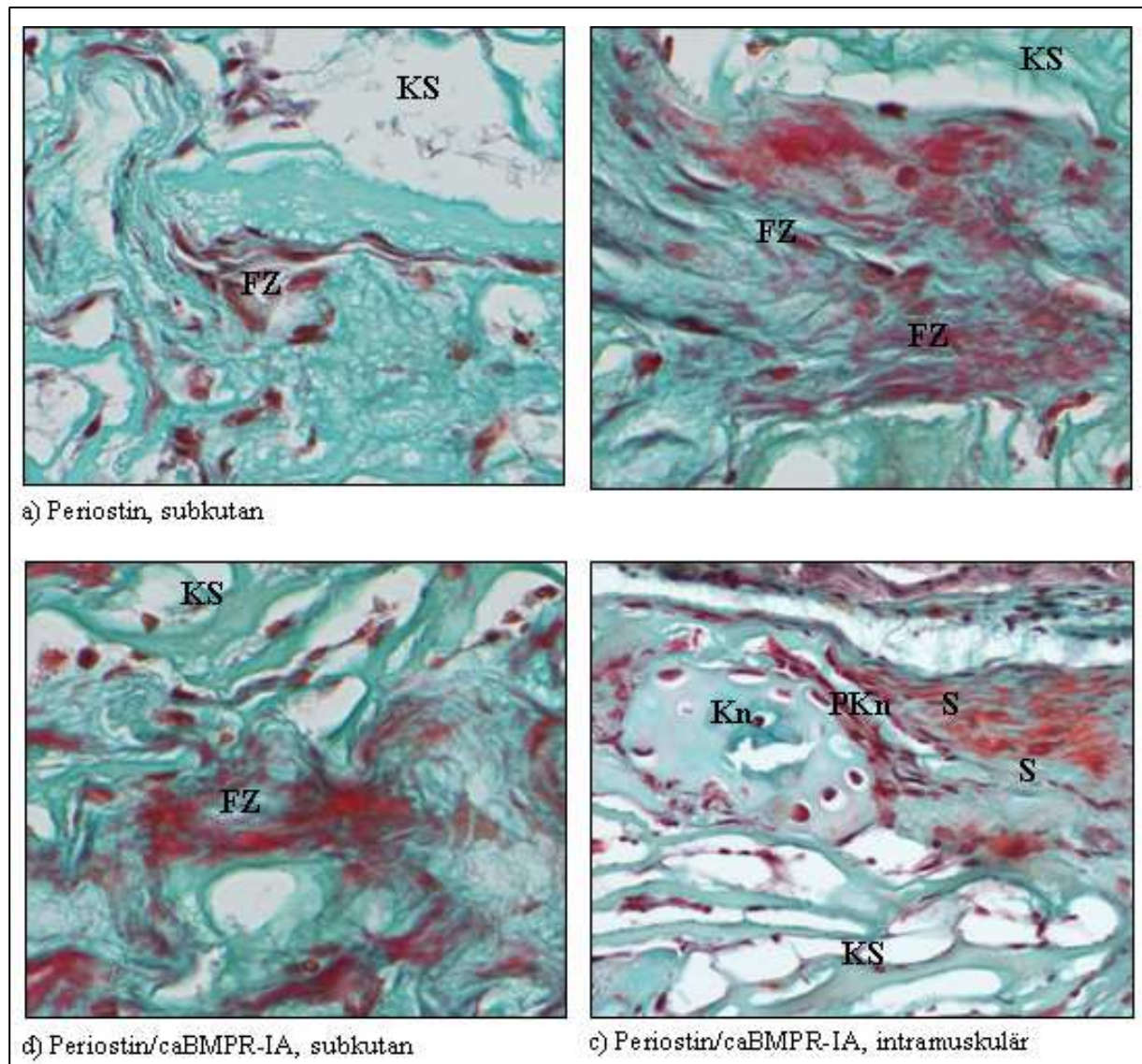
Es handelt sich um C3H10T1/2-Zellen, die lentiviral mit a) Periostin und GFP (subkutan), b) und c) Periostin, caBMPR-IA und GFP (intramuskulär) infiziert wurden. K = Knochen, Kn = Knorpel, FZ = Fibroblastoide Zellen, Vergrößerung 1:10

In dem subkutanen Implantat mit Periostin-infizierten C3H10T1/2-Zellen (Abbildung 55 a)) zeigte sich eine deutliche Ansammlung von mesenchymalen, fibroblastoiden Zellen (FZ), die eine überwiegend kollagenfaserartige, extrazelluläre Matrix produzierten. Auffallend waren weiterhin eine homogene extrazelluläre Matrix, die überwiegend eosinophil (rötlich in der Färbung) war und eine deutliche, multifokale basophile Tendenz. Eine Differenzierung der modifizierten mesenchymalen Stammzellen in Knorpel- oder Knochengewebe war nicht zu erkennen.

In den Abbildungen 55 b) und c) sind Hämatoxylin und Eosin-Färbungen von intramuskulären Präparaten abgebildet, die mit Periostin und caBMPR-IA lentiviral infiziert wurden. Dabei ist in der Abbildung 55 b) ist zu erkennen, dass es erneut zur Bildung von eosinophilen Anteilen der kollagen Matrix kam (rötliche Färbung). Des Weiteren sind multifokale Inseln mit einer eindeutigen Knochendifferenzierung (K) zu erkennen. Wie aus

dieser Abbildung ebenfalls hervorgeht, kam es zu einer ausgeprägten Mineralisierung der Osteoid-ähnlichen extrazellulären Matrix. In Abbildung 55 c) konnte ebenfalls die bereits erwähnte fibroblastoide Zellpopulation (FZ) mit Synthese einer eosinophilen, fibrillären extrazellulären Matrix erkannt werden. Die Zellen in diesem Bereich besaßen eine längliche Morphologie. Auffallend war in diesem Präparat die deutliche Osteoidbildung mit Ausbildung von knochen-ähnlichen Strukturen (K).

Des Weiteren wurde ein Präparat jeder Stufe mit der Trichrom-Färbung nach Goldner (siehe 3.7.3.3) gefärbt (Abbildung 56, Seite 102). Bei dieser Färbemethode wird kollagenes Bindegewebe grün und Zellkerne rot-braun angefärbt. Das Zytoplasma der Zellen wird ziegelrot gefärbt. Bei den in Abbildung 56a) und b) dargestellten Färbepreparaten handelte es sich um Gewebeproben, die mit Periostin-infizierten C3H10T1/2-Zellen behandelt und subkutan (a) sowie intramuskulär (b) implantiert wurden. In dem subkutanen Präparat konnte ein Gebiet mit einer Ansammlung von fibroblastoiden Zellen (FZ) (rot) nachgewiesen werden. Diese produzierten eine überwiegend locker, teils netzartig angeordnete extrazelluläre Matrix. Auch in der intramuskulären Gewebeprobe konnte die Synthese einer extrazellulären Matrix durch mesenchymale und fibroblastoide Zellen (FZ) in einem netzartigen Muster gefunden werden. Hinweise auf Knorpel- oder Knochenmetaplasien lagen nicht vor. Die in den Abbildungen 56 c) und d) dargestellten Schnitte der Kollagenschwämme, die mit Periostin- und caBMPR-IA-infizierten Zellen besiedelt und subkutan (c) sowie intramuskulär (d) implantiert wurden, bestätigen die zuvor beschriebenen Beobachtungen. Auch hier konnten die bereits erwähnten netzartigen, lockeren Strukturen einer teils fibrillären (FZ), teils homogenen extrazellulären Matrix erkannt werden. In Gegenwart von caBMPR-IA wird die Bildung von Knorpelgewebe erwartet. In dem subkutanen Präparat (c) konnten jedoch keine eindeutig ausgebildete Knorpel- oder Knochenstrukturen erkannt werden. In der intramuskulären Gewebeprobe (d) hingegen war die Bildung von Knorpelgewebe (Kn) eindeutig sichtbar. Angrenzend an diesem Bereich waren proliferierende Knorpelzellen (PKn) lokalisiert, die in schmale, lang gezogene Zellen mit einem parallelen faserigen Verlauf übergingen und in einer extrazellulären Matrix eingebettet waren. Die wellenförmige Morphologie dieser Zellen und der gerichtete Verlauf der kollagenartigen Fasern deuten auf eine sehnen-ähnliche Struktur hin.



**Abbildung 56:** Periostin/caBMPR-IA-abhängige Differenzierung von murinen C3H10T1/2-Zellen nach ektopischer Implantation. (Trichrom und Masson Goldner).

Es handelt sich um C3H10T1/2-Zellen, die lentiviral infiziert wurden mit a) Periostin und GFP (subkutan); b) Periostin und GFP (intramuskulär); c) Periostin, caBMPR-IA und GFP (subkutan), d) Periostin, caBMPR-IA und GFP (intramuskulär). Schnittstärke = 3µm; Vergrößerung: 1:10

Kn = Korpel, PKn = proliferierende Knorpelzellen, KS = Kollagenschwamm, S = sehnens-ähnliches Gewebe, FZ = fibroblastoide Zellen

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass bei Implantation mit Periostin- und caBMPR-IA-infizierten murinen mesenchymalen Stammzellen eine Differenzierung sowohl in Knorpel- und Knochenstrukturen, als auch in sehnens-ähnliches Gewebe stattgefunden hat.

#### 4.11 Implantation von infizierten humanen Stammzellen in Nacktmäuse: huMSCs mit Lentivirus Periostin und Periostin/ caBMPR-IA

Durch die Infektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit den lentiviralen Konstrukten Periostin und caBMPR-IA konnte gezeigt werden, dass die Zellen in sehnens-ähnliches Gewebe differenzierten. Der nächste Schritt war die lentivirale Infektion von humanen Stammzellen (huMSCs), um einen Vergleich des Differenzierungsverhaltens vornehmen zu können.



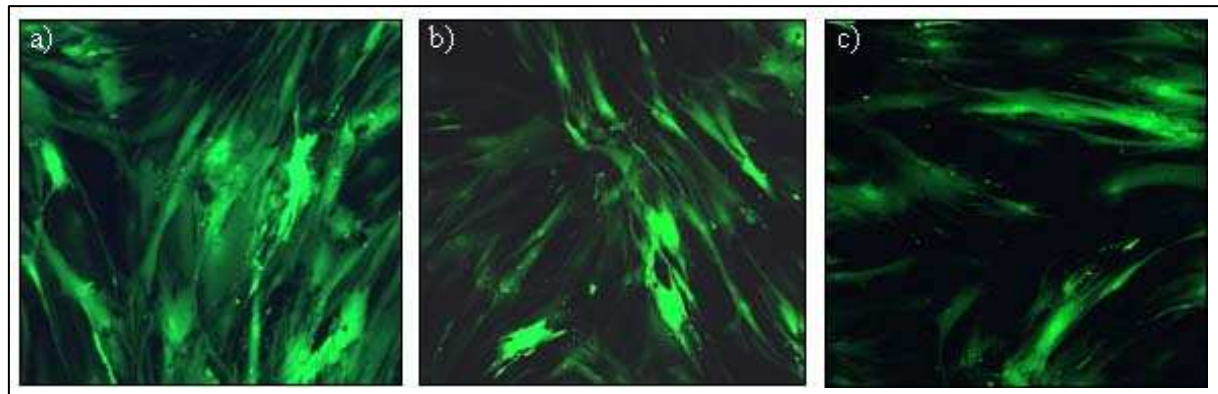
Für die Implantationsstudie wurden folgende Infektionen von mesenchymalen Stammzellen vorgenommen (Tabelle 15):

**Tabelle 15:** Infektionsschema für Implantationsversuche mit lentiviral-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen

Zelllinie	Vektor	Virus MOI (multiplicity of infection)	Maus
huMSCs	pLox	Periostin MOI 100 GFP MOI 100 MIK MOI 100	nu/nu
huMSCs	pLox	Periostin MOI 100 caBMPR-IA MOI 100 GFP MOI 100 MIK MOI 100	nu/nu
huMSCs	pLox	GFP MOI 100 MIK MOI 100	nu/nu
huMSCs	-	uninfiziert	nu/nu

Die infizierten huMSCs mit GFP dienten zur Kontrolle. Des Weiteren wurden uninfizierte Stammzellen implantiert, um eine mögliche spontane Differenzierung der implantierten Zellen *in vivo* auszuschließen.

Bevor die infizierten Zellen in die Mäuse implantiert wurden, konnte die Infektionseffizienz aufgrund der Expression von GFP kontrolliert werden. Vier Tage nach der Infektion lag die Infektionseffizienz bei 80 bis 85%, wobei einige Zellen im Hintergrund nur sehr schwach fluoreszierten. Die Abbildungen 57 a) bis c) zeigen die Fluoreszenz der Zellen aufgenommen mit einer Digitalkamera unter UV-Licht.



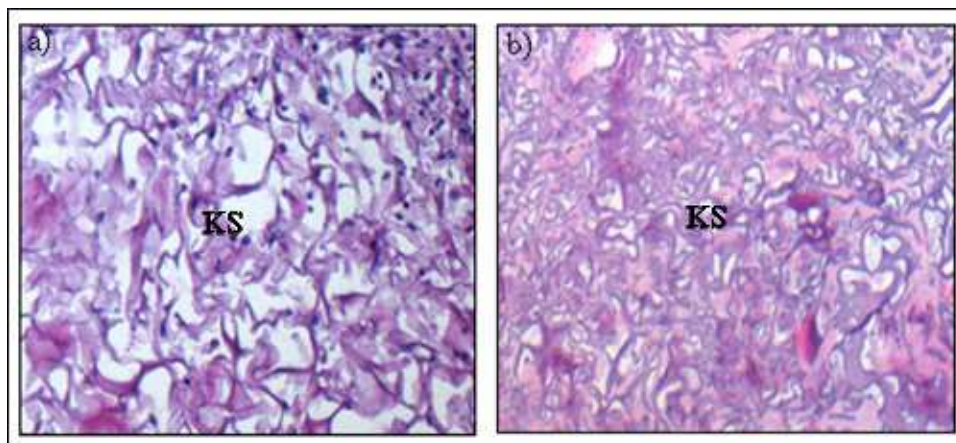
**Abbildung 57:** Humane mesenchymale Stammzellen lentiviral infiziert mit a) Periostin und GFP, b) Periostin, caBMPR-IA und GFP, c) GFP; Tag 4 nach Infektion. Diese Zellen wurden für die Implantationen verwendet. Vergrößerung 1:10

Nach vierwöchiger Implantationszeit wurden die Mäuse euthanasiert, die Gewebeproben entnommen und in Paraffin eingebettet. Bei der Explantation der Präparate konnte festgestellt werden, dass alle Proben, bis auf die GFP-behandelten Kollagenschwämme, eine weiche und elastische Konsistenz besaßen. Von jeder Gewebeprobe wurde auf drei unterschiedlichen Stufen jeweils ein Hämatoxylin und Eosin Schnittpräparat von 3µm Dicke angefertigt.

#### **4.11.1 Uninfizierte und GFP-infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren nicht in sehnens-ähnliches Gewebe**

Zur Überprüfung, ob lentivirale Infektion mit GFP einen Einfluss auf die Differenzierung der implantierten humanen MSC *in vivo* haben könnte, wurden diese in Nacktmäuse implantiert und histologisch untersucht (Abbildung 58 a)). Insgesamt wurden fünf subkutane und fünf intramuskuläre Kollagenschwämme implantiert. Die Durchführung erfolgte wie unter 4.2 beschrieben. Bei der Explantation konnten keine Besonderheiten in Bezug auf die Beschaffenheit der Präparate festgestellt werden.

In weiteren Implantationen wurden uninfizierte humane MSC in die Mäuse eingebracht (Abbildung 58 b)). Dieser Versuchsansatz sollte zeigen, dass die implantierten huMSCs *in vivo* nicht auffällig differenzierten.

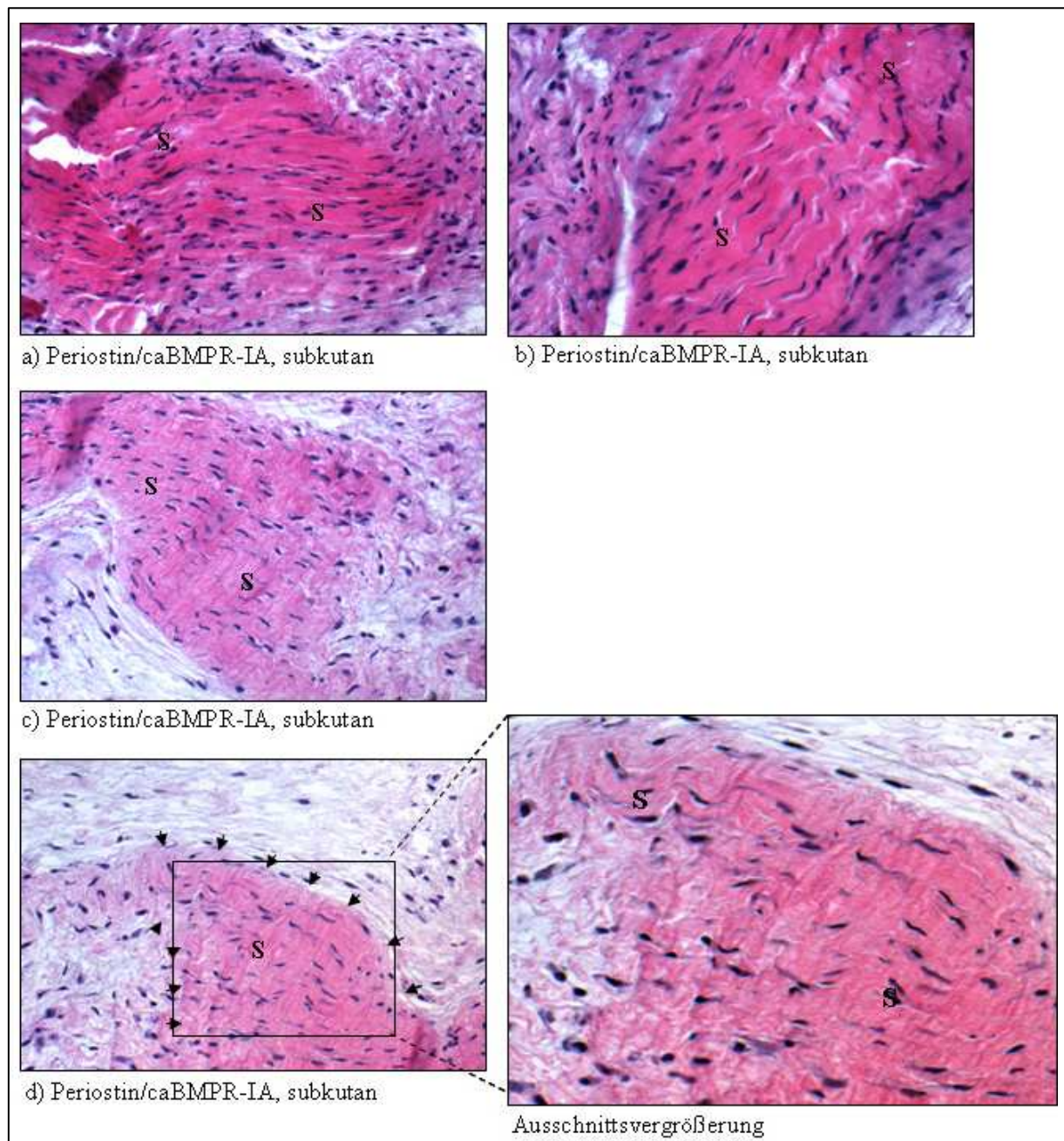


**Abbildung 58:** Differenzierung von humanen MSCs nach ektopischer Implantation (Hämatoxylin und Eosin). Es handelt sich um huMSCs, die mit a) GFP (subkutan) infiziert wurden und b) uninfiziert (subkutan) waren. Schnittdicke: 3µm, KS = Kollagenschwamm; Vergrößerung 1:10

Sowohl bei den implantierten Kollagenschwämmen mit GFP-lentiviral infizierten huMSCs, als auch bei den uninfizierten humanen mesenchymalen Stammzellen konnte keine Differenzierung der Zellen in eine bestimmte Richtung erkannt werden. Eine spontane Differenzierung der humanen MSCs in der Maus konnte somit ausgeschlossen werden.

#### **4.11.2 Periostin- und caBMPR-IA- infizierte humane mesenchymale Stammzellen differenzieren in sehnens-ähnliches Gewebe**

In den Abbildungen 59 a) bis d) (Seite 105) sind Hämatoxylin und Eosin gefärbte Gewebeschnitte dargestellt, die mit Periostin- und caBMPR-IA-infizierten humanen Stammzellen besiedelt und subkutan implantiert wurden.



**Abbildung 59:** Periostin/caBMPR-IA-abhängige Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen nach ektopischer Implantation. (Hämatoxylin und Eosin).

Die Schwämme lagen subkutan vor. Schnittdicke: 3 µm; Vergrößerung 1:10; S = Sehne

Bei dieser subkutanen Gewebeprobe konnte die Differenzierung der modifizierten humanen MSCs in sehnen-ähnliches Gewebe (S) wahrgenommen werden. Es zeigte sich der typisch gerichtete parallele Faserverlauf mit schmalen, lang gezogenen Zellen. Zudem besaßen die Zellen das wellenförmige „crimp-pattern“ Muster, was charakteristisch für Sehnen ist. Die Bereiche, in denen die Sehnenstruktur gefunden wurde, befanden sich außerhalb des Kollagenschwammes und waren sehr weitläufig. Die Ausschnittsvergrößerung von Abbildung d) lässt die faserartige Sehnenstruktur und die lang gestreckten Zellkerne besonders deutlich erkennen.

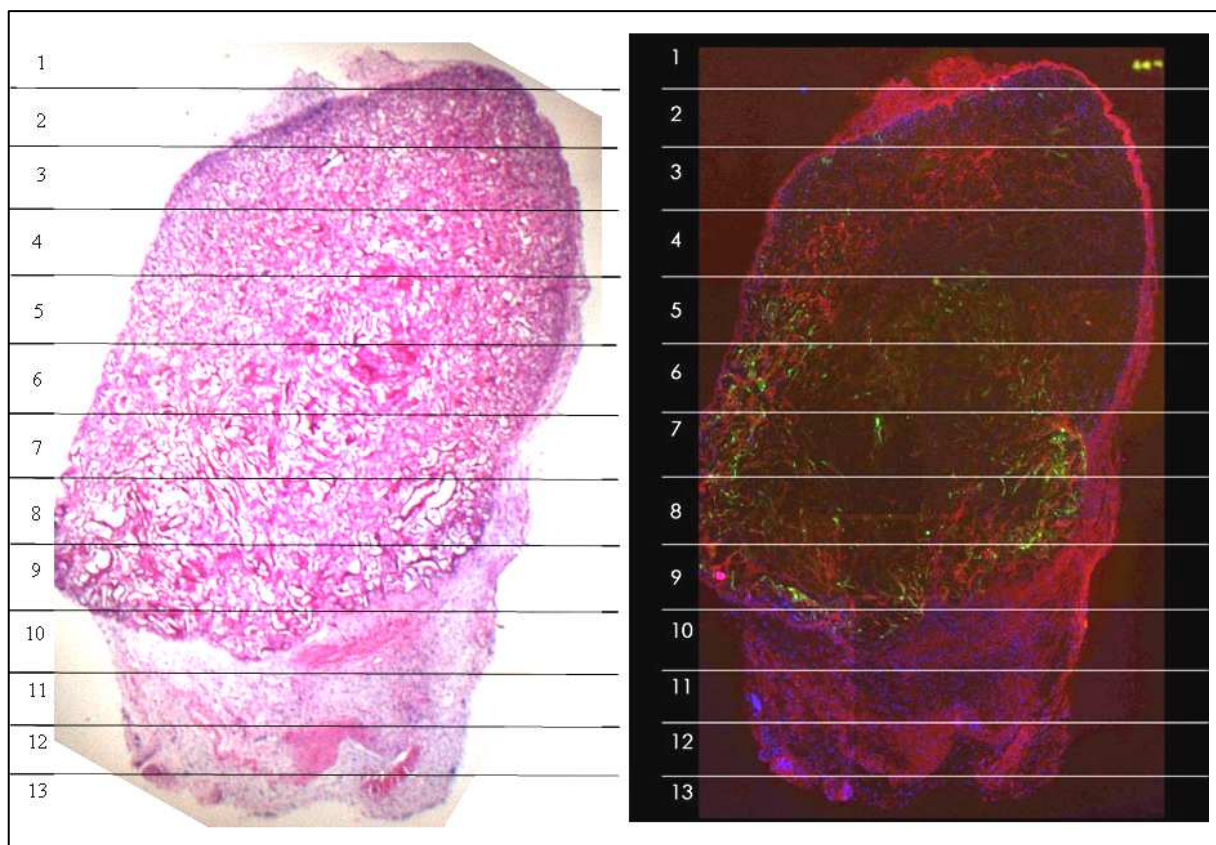
Die lentiviral-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen mit Periostin und caBMPR-IA lieferten somit ähnliche Ergebnisse wie die lentiviral-infizierten murinen mesenchymalen



Stammzellen. Es konnte gezeigt werden, dass Periostin in Kombination mit caBMPR-IA in der Lage war, in sehnen-ähnliches Gewebe zu differenzieren. C3H10T1/2-Zellen, die mit Periostin allein infiziert wurden, zeigten ebenfalls charakteristische Eigenschaften von Sehnenzellen. Humane Stammzellen, die mit dem Lentivirus Periostin allein infiziert wurden, zeigten hingegen keine auffälligen Merkmale (Daten nicht gezeigt).

#### 4.11.3 Nachweis der implantierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Sehnengewebe

Die Hämatoxylin und Eosin-Färbungen der infizierten und implantierten humanen MSCs mit Periostin und caBMPR-IA haben gezeigt, dass die Zellen in sehnenartiges Gewebe differenzierten, welches durch das typische crimp-pattern charakterisiert wurde. Um zu prüfen, ob die eingebrachten Zellen im neu gebildeten Gewebe lokalisiert sind, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern durchgeführt (siehe 3.7.4.2). Besonders eignete sich dafür der Kollagen Typ III – Antikörper, da dieses Kollagen den Hauptbestandteil in sehr frühem Sehnengewebe darstellt. Da die implantierten Zellen ebenfalls mit dem Lentivirus GFP infiziert wurden, konnte ein weiterer immunhistochemischer Nachweis mit einem GFP-Antikörper stattfinden. Es wurden Präparate der gleichen Schnittebene mit Antikörpern gefärbt und im Anschluss mit dem Ergebnis der zuvor durchgeführten Hämatoxylin und Eosin-Färbung verglichen. In Abbildung 60 sind die Ergebnisse der H+E- und Fluoreszenz-Färbungen dargestellt. Um die morphologisch interessanten Regionen besser zuordnen zu können, wurde das Präparat in 13 Ebenen unterteilt.



**Abbildung 60:** Vergleich zweier intramuskulärer Schnittpräparate nach einer Hämatoxylin und Eosin Färbung und einer immunhistochemischen Färbung mit einem Kollagen Typ III- und GFP-Antikörper.

Es handelt sich um einen implantierten Schwamm mit Periostin- und caBMPR-IA-infizierten humanen MSCs.

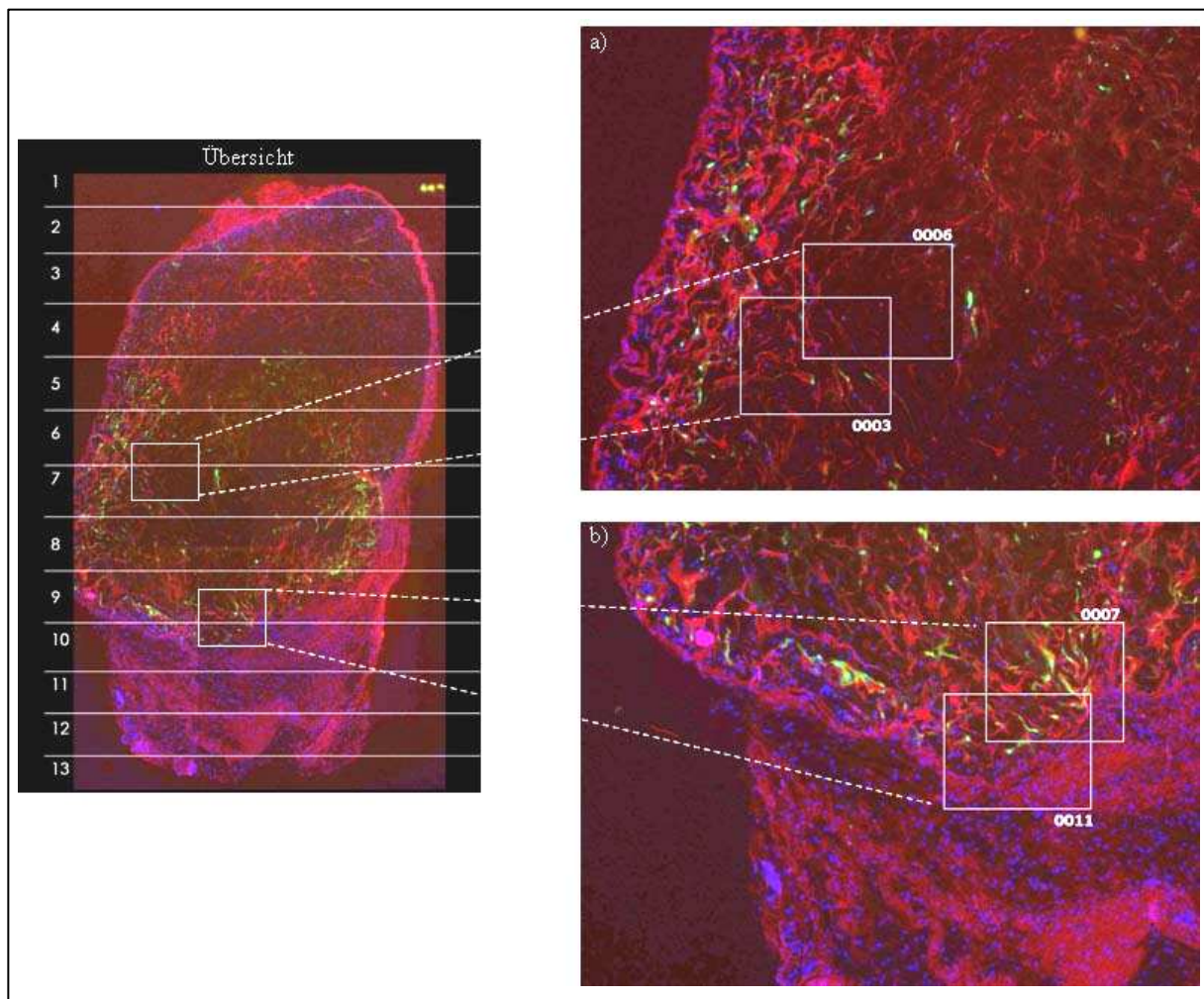
Links: Hämatoxylin und Eosin Färbung. Rechts: immunhistochemische Färbung mit Antikörpern. Rot: Kollagen III, Grün: GFP, Blau: DAPI-Zellkerne



Die Hämatoxylin und Eosin-Färbung zeigte, dass die Bereiche 10 und 12 besonders interessant waren, denn dort befanden sich die wellenförmigen sehnen-ähnlichen Strukturen. Die Vergrößerungen dieser Bereiche sind in den Abbildungen 59 a) bis d) dargestellt (Seite 105). Auffällig war, dass die interessanten Bereiche nicht im, sondern unterhalb des Kollagenschwammes lokalisiert waren. Die Übersichtsaufnahme der immunhistochemischen Färbung zeigte, dass in den Bereichen 10 bis 12 keine GFP-positiven Zellen lokalisiert waren. Diese Zellen konnten vielmehr im Schwamm, vor allem im Randbereich, lokalisiert werden. Die rot gefärbten Kollagen Typ III-Zellen befanden sich dagegen sowohl in dem Kollagenschwamm als auch im neu gebildeten sehnen-artigem Gewebe.

#### 4.11.3.1 Die implantierten humanen mesenchymalen Stammzellen befinden sich außerhalb des neu gebildeten Sehnengewebes

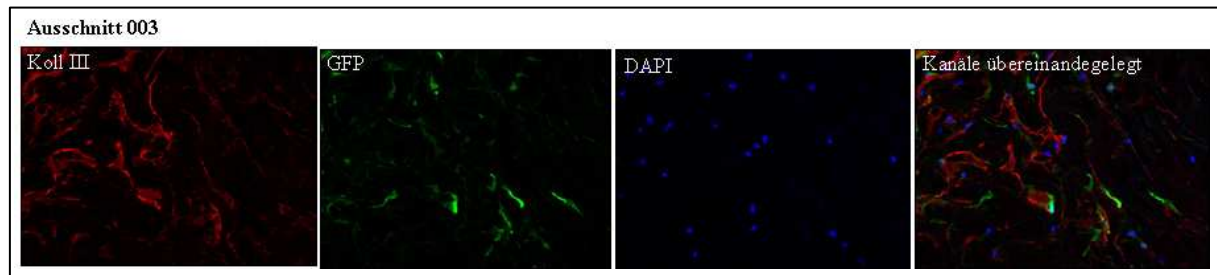
In den folgenden Abbildungen wurden Bereiche markiert, die GFP-positive Zellen enthielten (Abbildung 61). Dabei wurde zum einen ein Bereich im Zentrum des Gewebepreparates (Abbildung 62), und zum anderen ein Randabschnitt (Abbildung 63) gewählt.



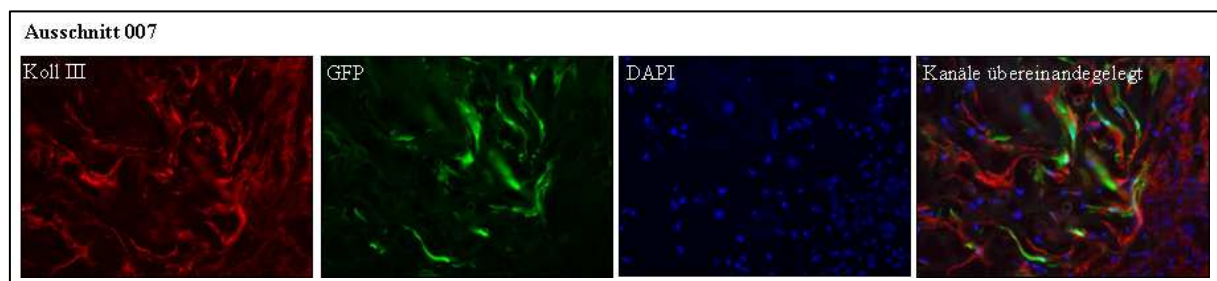
**Abbildung 61:** Schnittpräparat eines implantierten Schwammes mit Periostin- und caBMPR-IA-lentiviral infizierten humanen Stammzellen. Links: Übersicht; a) 0003 und 0006: Positive Färbung von *Kollagen Typ III* (rot) innerhalb des Implantates; b) 0007 und 0011: Positive Färbung von *Kollagen Typ III* (rot) und GFP (grün) am Rand des Implantates

Die *Kollagen Typ III*-positiven Zellen waren anhand ihrer roten Fluoreszenz im Implantat zu erkennen. Dabei musste aber berücksichtigt werden, dass der Schwamm ebenfalls eine rote Eigenfluoreszenz aufwies. Die grüne Fluoreszenz zeigte die GFP-exprimierenden Zellen. Aus den Abbildungen 61 bis 63 geht hervor, dass in einigen Zellen die Expressionen von *Kollagen*

*Typ III* und *GFP* ko-lokalisiert waren. Die Abbildungen zeigen aber auch, dass sich die implantierten humanen MSCs außerhalb des neu gebildeten sehnen-ähnlichen Gewebes befanden.



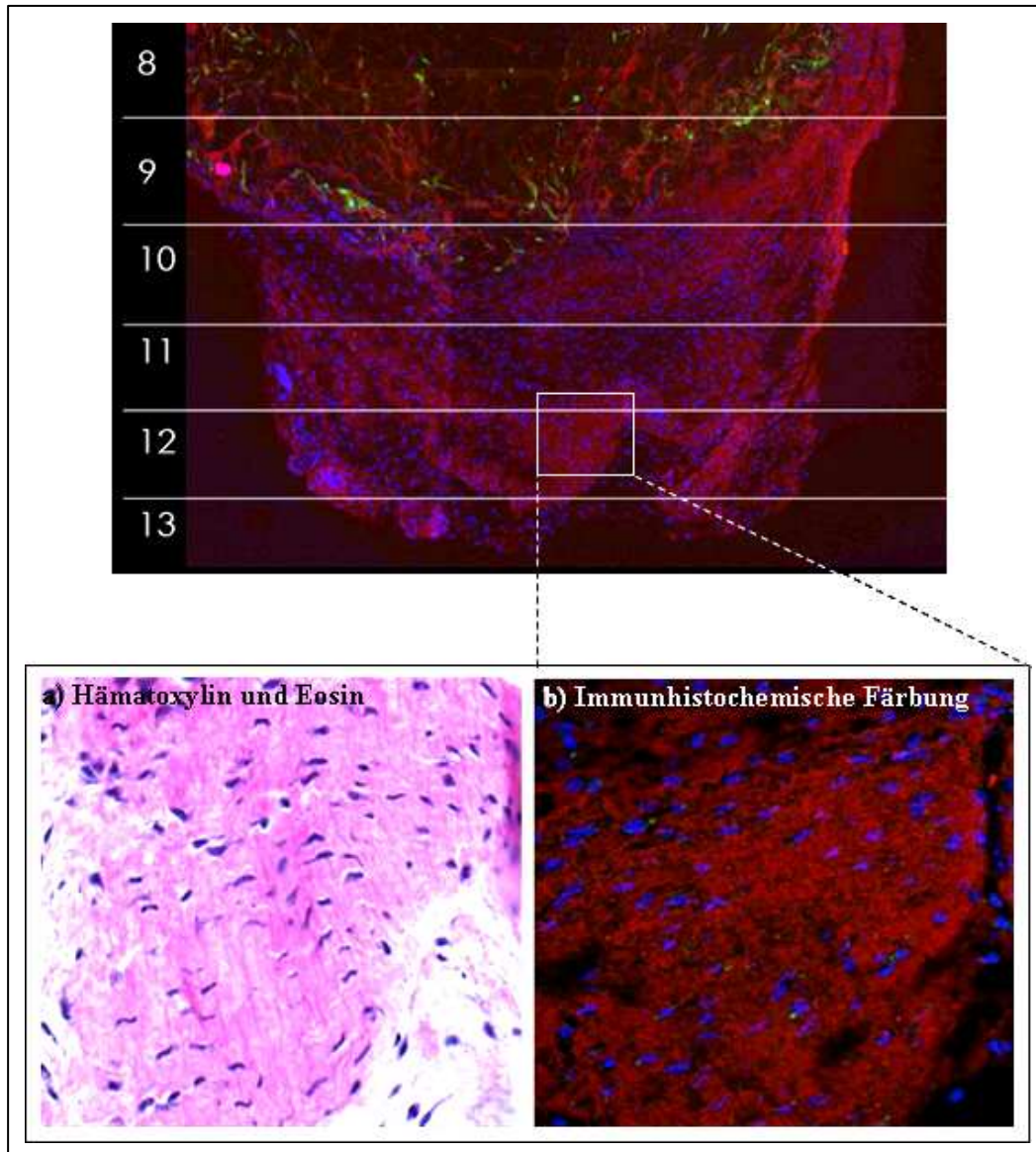
**Abbildung 62:** Nachweis von *Kollagen Typ III* und *GFP* im Zentrum des Implantates. Immunhistochemische Färbung mit einem *GFP* (grün)- und *Kollagen Typ III* (rot)-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit *DAPI* angefärbt. Im rechten Bild wurden die Fluoreszenz-Kanäle übereinander gelegt.



**Abbildung 63:** Nachweis von *Kollagen Typ III* und *GFP* am Rand des Implantates. Immunhistochemische Färbung mit einem *GFP* (grün)- und *Kollagen Typ III* (rot)-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit *DAPI* angefärbt. Im rechten Bild wurden die Fluoreszenz-Kanäle übereinander gelegt.

Der Vergleich des Zentrums des Implantates mit der Randregion zeigte, dass sich die implantierten Zellen zum größten Teil eher am Rand des Schwammes befanden. Dort konnten die meisten positiven Zellen nachgewiesen werden.

In Bereichen, in denen die sehnen-ähnlichen Strukturen beobachtet wurden, konnten keine positiven *GFP*-Zellen angefärbt werden. Die wellenförmigen Strukturen der Zellen bzw. der Zellkerne konnten aber durch Anfärbung der Zellkerne mit *DAPI* identifiziert werden (Abbildung 64). Zudem zeigte die immunhistochemische Färbung dieser Gewebeprobe mit dem *Kollagen Typ III*-Antikörper eine intensive Rotfärbung des neu gebildeten Gewebes. Der Kollagenschwamm zeigte bei dieser Färbung zwar eine rote Eigenfluoreszenz, konnte aber durch die schwächere Färbung eindeutig unterschieden werden.



**Abbildung 64:** Identifizierung der sehnen-ähnlichen Struktur durch Fluoreszenz-Färbung.

a) Hämatoxylin und Eosin-Färbung, b) immunhistochemischer Nachweis mit einem Kollagen Typ III (rot) – und einem GFP (grün) -Antikörper

Die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises mit Antikörpern haben gezeigt, dass sich die implantierten Zellen überwiegend am Rand des eingebrachten Kollagenschwammes befanden. Das neu gebildete sehnen-ähnliche Gewebe befand sich außerhalb des Schwammes. Da es sich bei Periostin um ein sekretiertes Protein handelt, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das implantierte Periostin aus den humanen mesenchymalen Stammzellen in das umliegende Mausgewebe sekretiert ist und dort Signalwege stimuliert hat, die die Sehnenbildung induzierten.

## 5 Diskussion

Über die Entwicklung und Differenzierung von Sehnen ist nur wenig bekannt. Es gibt mit Ausnahme des Transkriptionsfaktors *Scleraxis* bisher keine spezifischen Markergene, anhand derer die Entwicklung von Sehnen verfolgt werden könnte und die weiteren Aufschluss über die möglichen, an der Sehnenbildung beteiligten Faktoren und Signalwege geben könnte. *Scleraxis* wurde zuerst 1995 von Cserjesi et al. in der Maus als ein heteromerer Partner des ubiquitären bHLH-Transkriptionsfaktors *E12* identifiziert. Es war bereits bekannt, dass die Mitglieder der bHLH-Familie von Transkriptionsfaktoren das Wachstum und die Differenzierung von zahlreichen Zelltypen regulieren, und ihnen wurde auch eine wichtige Rolle während mesenchymaler Differenzierungsprozesse einschließlich der Entwicklung von Sehnen zugesprochen (Cserjesi et al., 1995; Schweitzer et al., 2001; Brent et al., 2003).

Sehnenverletzungen werden ähnlich wie Gelenkzerrungen und Bänderrisse durch Überdehnung hervorgerufen. Sehngewebe ist im Allgemeinen schlechter durchblutet, so dass immer wiederkehrende und unbemerkte kleinere Verletzungen zum Sehnenverschleiß führen. Kommt es dann zu einer starken Dehnung, so kann die vorgeschädigte Sehne reißen. Sehnen- und Bänderverletzungen gehören zu einer der am häufigsten auftretenden Sportverletzungen. In Amerika werden jährlich bis zu 200.000 Patienten wegen einer Sehnenverletzung behandelt. Die Behandlung besteht darin, die Sehnenenden wieder zusammenzuführen, was bei Teilrissen auch ohne Operation mit Gipsbehandlung durchgeführt werden kann. In den meisten Fällen ist die Sehne jedoch vollständig gerissen, so dass eine Operation erforderlich wird. Heutzutage werden drei verschiedene Methoden angewendet: die Sehnennaht, die Sehnenverlagerung und die Sehnenverpflanzung (Olson et al., 1988; Sabiston et al., 1990; Jackson et al., 1992). Diese Therapiemöglichkeiten führen aber aufgrund der Narbenbildung zu einem mechanisch weniger belastbaren Gewebe.

Das Tissue Engineering bietet bei Band- und Sehnenverletzungen potenziell Möglichkeiten, die Gewebeheilung im Vergleich zu den traditionellen Behandlungsoptionen zu verbessern. Applikationen von bestimmten Faktoren könnten den komplexen Prozess der Sehnen- und Bänderheilung positiv beeinflussen. Die Untersuchungen einiger Wachstumsfaktoren zeigten, dass sie die Fähigkeit besitzen, die Sehnen- und Ligamentbildung zu induzieren. Zu diesen Faktoren gehört die Familie der bone morphogenetic proteins (BMPs), einschließlich der Wachstumsfaktoren 5, 6 und 7 (GDF 5, 6 und 7). Wolfman et al. haben gezeigt, dass diese GDF-Proteine bei ektopischen Implantationen *in vivo* zu einer Sehnen- und Ligamentbildung führen. Andere Untersuchungen zeigten, dass GDF-Proteine die Knochen- und Knorpelbildung *in vivo* induzieren. In einem Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass der Transfer des BMP 12-Gens in die Sehnenstümpfe von Mäusen eine beschleunigte Heilung der durchtrennten Sehne erzielte (Lou et al., 2001).

### 5.1 Der Einfluss von Smad8 L+MH2 auf die Differenzierung von rekombinant exprimierenden C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen

In vorangegangenen Studien wurde bereits untersucht, welche Auswirkungen die Rezeptor-regulierte und biologisch aktive Form von Smad8 auf die Differenzierung von rekombinant BMP2-exprimierenden murinen mesenchymalen Stammzellen hat (Hoffmann et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass *in vitro* bei Überexpression von Smad8 L+MH2 in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen eine Differenzierung der Zellen in Tenozyten-ähnliche Zellen stattfand, während die überexprimierenden C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen mit Wildtyp Smad8 in Richtung Osteogenese differenzierten. Diese Resultate lieferten die Grundlage für weitere Analysen der Smad8-vermittelten Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.



Die Untersuchung der Expressionsmuster von diversen Markergenen sollte einen ersten Hinweis auf molekulare Mechanismen für das Differenzierungsverhalten der C3H10T1/2BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen geben (Abbildung 23). In den undifferenzierten Zellen konnte keine Expression von *Scleraxis* erkannt werden. Im Vergleich dazu fand in den C3H10T1/2BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen bereits am 7. Tag nach Konfluenz der Zellen eine hohe Expression von *Scleraxis* statt. Es scheint, dass diese Zellen sehr früh in Tenozyten differenzierten. Bis zum Ende der Kultivierung wurde die Expression wieder schwächer. Möglicherweise wird *Scleraxis* nur zur Induktion der Tendogenese benötigt. Im Gegensatz dazu stieg die *Scleraxis*-Expression in der späten Phase der Entwicklung der C3H10T1/2BMP2-Zellen an. Dies könnte damit zusammenhängen, dass *Scleraxis* in geringer Konzentration auch in Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert wird. Die Untersuchungen des Gens *Scleraxis* haben somit gezeigt, dass dieser als tendogener Marker angesehen werden kann, da in den C3H10T1/2BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen keine Chondrogenese und Osteogenese beobachtet wurden, das Markergen jedoch exprimiert wurde. In den C3H10T1/2BMP2-Zellen hingegen kann die Expression von *Scleraxis* auf die Anwesenheit von Chondrozyten und Osteoblasten zurückgeführt werden.

Weitere Gene, die untersucht wurden, waren die Transkriptionsfaktoren *Six1* und *Six2* sowie *Eya1* und *Eya2* und die Rezeptor-Tyrosin-Kinase *EphA4*. Diese Gene werden in sich entwickelnden Sehnen exprimiert (Mikic et al., 2001; Settle et al., 2003). Aus den RT-PCR-Analysen ging hervor, dass *Six2* und *EphA4* zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Tendogenese exprimiert werden. Interessant war, dass zu dem Zeitpunkt, wo *Six2* wieder herunterreguliert wurde, die Expression von *Six1* anstieg. Des Weiteren konnte eine kontinuierlich hohe Expression von *EphA4* wahrgenommen werden.

Ein spätes Markergen der Osteogenese ist das *Osteocalcin*. Dieses Gen wurde in den C3H10T1/2BMP2/Smad8 L+MH2 nur moderat herunterreguliert, obwohl keine histologischen Hinweise auf eine stattgefundene Osteogenese vorlagen.

*Kollagen Typ I*, ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, wird während der Osteogenese und Tendogenese sekretiert und bildet auch den Hauptanteil dieser beiden Zelltypen. Daher war es nicht verwunderlich, dass *Kollagen Typ I* in allen drei Zelllinien über den gesamten Zeitraum kontinuierlich exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu wurden der Osteoblasten- und Chondrozytenmarker *PTH/PTHrP*-Rezeptor und das *Kollagen Typ II* in Anwesenheit von Smad8 L+MH2 stark herunterreguliert.

Das Expressionsverhalten einiger dieser Markergene zeigte, dass in Anwesenheit der konstitutiv aktiven Form von Smad8 die Entwicklung der C3H10T1/2BMP2-Zellen in Chondrozyten und Osteoblasten unterdrückt, die Differenzierung in Tenozyten aber gefördert wurde.

## 5.2 C3H10H1/2BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen differenzieren in Knochen-, Knorpel- und Sehngewebe

Zur Untersuchung des *in vivo* Differenzierungsverhaltens von modifizierten murinen und humanen Stammzellen wurde ein Mausmodell zur Herstellung ektopischer Sehnen entwickelt (siehe 4.2). Bei den ersten Implantationen wurde die Differenzierung von rekombinant exprimierenden C3H10T1/2BMP2- (Abbildung 26) mit C3H10T1/2BMP2/Smad8 L+MH2-Zellen (Abbildung 27) verglichen. Wie erwartet, differenzierten die Zellen im BMP2-Hintergrund in die drei Zelltypen Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten. Die Zellen, die zusätzlich Smad8 L+MH2 synthetisierten, differenzierten hingegen in sehnen-ähnliches Gewebe. Die Bildung von Knochen oder Knorpel konnte nicht festgestellt werden. Es scheint, dass Smad8 L+MH2 den tendogenen Signalweg fördert, den osteogenen Signalweg hingegen unterdrückt. Die erzielten *in vivo* Ergebnisse erhärten die Resultate der Markergenanalyse.

### 5.3 Differenzierungsstudie von Ad-Smad8 L+MH2-/Ad-BMP2-, Ad-Smad8 L+MH2- sowie Ad-Smad8-Wildtyp infizierten C3H10T1/2-Zellen

Die *in vitro* Analysen der infizierten murinen mesenchymalen Stammzellen mit den Adenoviren Smad8 L+MH2 und BMP2, Smad8 L+MH2 allein und Smad8 Wildtyp (siehe 4.4) zeigte keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Lediglich die Zellen im BMP2-Hintergrund zeigten bei Anfärbung mit Alkalischer Phosphatase die Bildung von Osteoblasten. Eine typische lang gezogene Zellstruktur konnte in Gegenwart von Smad8 L+MH2 aber nicht erzielt werden.

Bei der Entwicklung von Sehnen wird davon ausgegangen, dass ein gerichteter Zug für die vollständige Ausbildung der Sehnenstruktur notwendig ist. Sadoshima et al. (1992) und Graf et al. (2003) haben in einem Verfahren beschrieben, wie sie eine gerichtete Zugkraft in einer *in vitro* Kultur erreicht haben. Die Zellen wurden auf eine mit Gelatine beschichtete Silikonmembran ausgesät. Diese Membran wurde zwischen zwei Trägern fixiert, wobei einer dieser Träger fest installiert wurde und der andere beweglich war. Der bewegliche Träger war in der Lage auf zwei parallelen Stangen entlang zu gleiten. Durch diese Streckapparatur konnte entweder eine permanente Streckung oder eine pulsierende Streckung der Silikonmembran erfolgen und ermöglichte so, den Einfluss von mechanischer Belastung auf die Differenzierung von Zellen zu untersuchen.

Die Zellen der hier vorgestellten Differenzierungsstudien wurden jedoch keinen Zugkräften ausgesetzt. Das könnte ein möglicher Grund sein, warum in den adenoviral-modifizierten Zellen *in vitro* keine morphologischen Veränderungen der Zellen in Tenozyten beobachtet werden konnten, während dies bei plasmid-basierter Expression der Fall war (siehe 5.1). Daher kann davon ausgegangen werden, dass gerichteter Zug zwar förderlich für die Entwicklung von Sehnenstrukturen sein könnte, aber scheinbar nicht unter allen Bedingungen notwendig ist. Des Weiteren könnte die Höhe der Proteinexpression einen Einfluss auf die Differenzierung ausüben. Bei adenoviraler Infektion von Zellen werden die Proteine womöglich geringer exprimiert als bei plasmid-basierter Expression.

Trotz hier fehlender veränderter Zellmorphologie in Tenozyten wurde die Genexpression bestimmter Markergene mit Hilfe von RT-PCR-Analysen untersucht (Abbildung 32). Wie schon bei den rekombinanten Zelllinien wurde auch bei dieser Differenzierungsstudie in Gegenwart von Smad8 L+MH2 und BMP2 der Transkriptionsfaktor *EphA4* zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierung exprimiert. Dieser Verlauf deutete darauf hin, dass die Zellen doch in Richtung Tendogenese differenzierten. Ohne BMP2 verlief die Expression schwächer. Die Anwesenheit von BMP2 scheint die Smad8 L+MH2-abhängige Differenzierung zu Sehnenzellen zu unterstützen.

Ebenfalls wurde das Gen *Six2* in BMP2/Smad8 L+MH2-modifizierten C3H10T1/2-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt exprimiert. In Smad8 L+MH2-Zellen ohne BMP2-Hintergrund konnte der *Six2*-Expressionsverlauf mit den Ergebnissen der Smad8 Wildtyp- und Kontrollzellen verglichen werden. Somit konnte auch bei diesem Markergen eine verstärkte stammzellabhängige Differenzierung von Smad8 L+MH2 in Gegenwart von BMP2 in Richtung Tendogenese beobachtet werden.

Besonders auffällig war das Expressionsmuster des Typ-II-Transmembran-Glykoproteins *Tenomodulin*, welches vorwiegend in Sehnen, Ligamenten und im Auge exprimiert wird und daher als potentieller Marker für Sehnen angesehen werden kann (Docheva et al., 2005). Weder in den Kontrollzellen noch in den Smad8 Wildtyp-infizierten C3H10T1/2-Zellen kam es zu einer Expression von *Tenomodulin*. In Gegenwart von Smad8 L+MH2 wurde dieses Gen jedoch zu einem frühen Zeitpunkt exprimiert, schwächte dann aber bis zum 14. Tag der Differenzierung ab. Das BMP2-Protein verstärkte erneut diesen Effekt. Eine Untersuchung von *Tenomodulin*-defizienten Mäusen zeigte, dass sich die Tenozyten-Proliferation

verminderte, was zu einer reduzierten Tenozyten-Dichte führte. Daher wird vermutet, dass *Tenomodulin* die Tenozyten-Proliferation moduliert und bei der Reifung von Kollagenfibrillen eine Rolle spielt (Docheva et al., 2005). Womöglich wäre dieser morphologische Effekt bei einer Kultivierung der adenoviral-infizierten Zellen über einen längeren Zeitraum als 14 Tage zu beobachten gewesen.

In allen modifizierten murinen Stammzellen wurde das *Kollagen Typ I* über den gesamten Differenzierungszeitraum hoch exprimiert. Wie erwähnt, handelt es sich bei diesem Protein um die Hauptsubstanz der extrazellulären Matrix und wird während der Osteogenese und Tendogenese sekretiert. Somit wurde dieses Expressionsmuster auch erwartet. Eine eindeutige Aussage über das Differenzierungsverhalten in Richtung Tendogenese kann anhand dieses Markergens aber nicht getroffen werden.

*Osteocalcin*, ein später Marker der Osteogenese, wurde nur in den BMP2-modifizierten Zellen stark exprimiert und entsprach somit den Erwartungen. Die Alkalische Phosphatase-Färbung zeigte ebenfalls die Differenzierung der Zellen in Osteoblasten.

Die *Kollagen Typ II*-Expression wurde ebenfalls nur in den Zellen, die zusätzlich BMP2 enthielten, über die gesamte Kinetik exprimiert. Ansonsten nahm die anfängliche Expression bis zum 14. Tag kontinuierlich ab.

Obwohl auf morphologischer Ebene keine Differenzierung der Smad8 L+MH2-modifizierten C3H10T1/2-Zellen in Richtung Tendogenese beobachtet werden konnte, zeigten die untersuchten Markergene, vor allem *Tenomodulin*, ein für Sehnenzellen typisches Expressionsmuster.

#### **5.4 Implantation von Ad-Smad8 L+MH2-/Ad-BMP2-, Ad-Smad8 L+MH2- sowie Ad-Smad8 Wildtyp-infizierten C3H10T1/2-Zellen in C3H/HeN-Mäuse**

Um eine Belastung oder einen gerichteten Zug auf adenoviral-modifizierte C3H10T1/2-Zellen ausüben zu können und um das Differenzierungsverhalten der Smad8 L+MH2-infizierten murinen mesenchymalen Stammzellen *in vivo* zu untersuchen, wurden Implantationsversuche wie unter 4.5 beschrieben durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die mit den adenoviral BMP2- und Smad8 L+MH2- modifizierten C3H10T1/2-Zellen innerhalb von vier Wochen eine neue Enthese bilden konnten (Abbildung 34 und 35). Die solchermaßen modifizierten murinen mesenchymalen Stammzellen waren in der Lage, in Knochen-, Knorpel- und Sehngewebe zu differenzieren. Ferner kam es dabei zur Ausbildung eines Knochen-Sehnen-Überganges, der dem Aufbau einer apophysären Sehnenansatzzone ähnelte (Vergleich Einleitung 1.1.1). Die Anfärbung des Präparates mit Toluidinblau zeigte drei der vier Zonen eines apophysären Überganges (Abbildung 35 b): sehnenartiges Gewebe, nicht-mineralisierter Faserknorpel und mineralisierter Knochen. Die Zellen der ersten Zone verliefen wellenförmig und wiesen das typische „crimp-pattern“ einer Sehne auf. Des Weiteren besaßen diese Zellen einen parallelen und gerichteten Verlauf und waren schmal und lang gezogen. Es konnte ein direkter Übergang dieser „Sehnenzellen“ in proliferierende Knorpelzellen beobachtet werden. Diese Knorpelzellen bildeten die Zone des nicht-mineralisierten Faserknorpels. Angrenzend an diesen Bereich bildete sich Knochengewebe aus. Somit konnte durch die Implantation von modifizierten C3H10T1/2-Zellen mit den Adenoviren Smad8 L+MH2 und BMP2 ein Knochen-Sehnen-Übergang generiert werden. Der gerichtete Zug und die Belastung, die bei *in vivo* Versuchen auf die implantierten Zellen ausgeübt werden, könnten einen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen in Richtung Tendogenese haben.

Die Ergebnisse der Implantationen von adenoviral-infizierten C3H10T1/2-Zellen mit Smad8 L+MH2 allein zeigten, dass auch diese in sehnen-ähnliches Gewebe differenzierten



(Abbildung 38 und 39). Die Zellen besaßen den typischen parallelen und gerichteten Verlauf und waren dünn und lang gezogen. Da die Implantation von modifizierten Smad8 Wildtyp-Zellen (Abbildung 40) zu keiner Differenzierung in Sehnengewebe geführt hat, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die konstitutiv aktive Variante von Smad8 ausreichend für die Differenzierung der murinen mesenchymalen Stammzellen in Richtung Tendogenese ist. Es scheint, dass das Protein Smad8 L+MH2 allein in der Lage ist, eine stammzellabhängige Bildung von sehnens-ähnlichem Gewebe hervorzurufen. In Anwesenheit von BMP2 werden weitere Signalwege aktiviert, was letztendlich zur Generierung einer Entthese führen kann. Hashimoto et al. (2007) haben gezeigt, dass in zwei Phasen eine direkte Entthese gebildet werden kann. Sie haben zunächst rekombinantes humanes BMP2 (rhBMP2) in die Beuger-Sehne eines Kaninchens injiziert, um ektopisch eine Ossikelbildung zu generieren. In einem zweiten Schritt wurde der erzeugte Sehnen/Ossikel-Komplex auf die Oberfläche des Kaninchen-Schienbeins transferiert, um einen stabilen Knochen-Sehnen-Übergang zu generieren. Einen Monat nach dem chirurgischen Eingriff konnte eine direkte Insertion des Knochen-Sehnen-Überganges im proximalen Schienbein des Kaninchens festgestellt werden. Damit wurde gezeigt, dass BMP2 eine wichtige Rolle bei der Bildung einer Entthese übernimmt und bestätigt die in dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse.

Bei der Auswertung dieser Implantationsversuche muss allerdings beachtet werden, dass es bei diesen Versuchen noch nicht möglich war, die adenoviral-modifizierten Zellen von den Wirtszellen zu unterscheiden. Daher kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die untersuchten Strukturen allein durch die adenoviral-infizierten Zellen gebildet wurden. Es könnte ebenfalls sein, dass die Bildung der Entthese durch die Wirtszellen erfolgte oder sowohl Wirts- als auch Spenderzellen an der Entwicklung des Gewebes beteiligt waren. Eine Möglichkeit, die eingebrachten adenoviral-infizierten Zellen von den Wirtszellen zu unterscheiden, liegt in einem immunhistochemischen Nachweis der eingebrachten Zellen über eine Antikörperreaktion. Smad8 L+MH2 besitzt ein Flag-Epitop, über das das Protein bereits im Western Blot nachgewiesen wurde (Abbildung 33). Über diesen Flag-Tag wäre der immunhistochemische Nachweis von Smad8 L+MH2 möglich. Das Problem bei diesem Nachweis liegt darin, dass nicht alle Antikörper in formalin-fixiertem Gewebe funktionsfähig sind. Des Weiteren handelt es sich um einen Antikörper aus der Maus. Daher ist ein spezifischer Nachweis der eingebrachten Proteine im Mausgewebe meist nicht möglich. Kollagen-Antikörper sind oft paraffin-gängig. Da die Hauptbestandteile von Sehnen Kollagene sind, würde sich ein Nachweis mit einem Kollagen-Antikörper ebenfalls gut eignen.

### **5.5 Implantation von LV-Smad8 L+MH2-/LV-BMP2- und LV-BMP2-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen in Nacktmäuse**

Humane mesenchymale Stammzellen können aus Knochenmarkaspiraten gewonnen werden und stellen aufgrund ihres mesenchymalen Differenzierungspotentials und ihrer guten *in vitro*-Expansionseigenschaften eine attraktive Zellpopulation für Tissue Engineering dar. Aus diesem Grund wurden für die Implantationsversuche auch humane MSCs verwendet. Wie unter 1.8 beschrieben, haben sowohl pLox- als auch pHRTK-vektorbasierte Lentiviren den Vorteil gegenüber Adenoviren, dass sie ihr Genom in die Erbsubstanz der Wirtszelle einbauen und die Virus-DNA dadurch ein fester Bestandteil des Wirtsgenoms wird. Eine Besonderheit der pLox-Lentiviren ist die Tetracyclin-abhängige Expressionskontrolle. Ein Vorteil, der bei den pHRTK-basierten bicistronischen Lentiviren besonders bei Infektionsversuchen zum Tragen kam, war der Nachweis der Infektion durch die GFP-Fluoreszenz. Einige Tage nach der Infektion konnte die Infektionseffizienz durch die grüne Fluoreszenz direkt abgeschätzt werden. Bei pLox-basierten Lentiviren war dies erst durch Analyse der Proteine im Western Blot möglich. Allerdings ist es gerade im Hinblick auf einen möglichen Einsatz der Lentiviren

im Bereich der Gentherapie wichtig, dass die Expressionshöhe der Transgene genau kontrolliert werden kann. Ebenfalls kann eine pLox-abhängige Proteinexpression durch Entzug von Doxycyclin vollständig abgeschaltet werden. Für eine Gentherapie wäre somit das pLox-System mit dem Tet-Kontrollsystem besser geeignet.

Es sollte ein Vergleich der BMP2- sowie Smad8 L+MH2- und BMP2-adenoviral-modifizierten murinen mit zunächst pHRTK-vektorbasierten lentiviral-infizierten humanen mesenchymalen Stammzellen vorgenommen werden.

Die Analyse der subkutanen und intramuskulären Gewebeproben mit Hämatoxylin und Eosin zeigten, dass auch lentiviral-modifizierte humane MSCs in der Lage sind, sowohl in sehnensähnliches Gewebe als auch in Knochen zu differenzieren (Abbildung 43 und 44). Humane mesenchymale Stammzellen, die nur mit BMP2 modifiziert wurden, differenzierten in Knochengewebe (Abbildung 43). Die eingebrachten lentiviral-modifizierten huMSCs konnten durch Anfärbung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin auf der Oberfläche der Stammzellen nachgewiesen werden (Abbildung 44). Somit konnte gezeigt werden, dass die implantierten, BMP2-modifizierten humanen MSCs am Implantationsort verblieben und an der Bildung von Knochengewebe beteiligt waren.

In den Präparaten von Kollagenschwämmen, die mit den Lentiviren BMP2 und Smad8 L+MH2 behandelt wurden, waren neben Knochengewebe auch sehnensähnliche Strukturen zu erkennen (Abbildung 45). Die huMSCs zeigten eine geordnete und parallele Struktur und verliefen wellenförmig. Auffällig war, dass in den intramuskulären Präparaten stärker ausgeprägte Sehnenstrukturen beobachtet wurden. Dieses könnte dadurch erklärt werden, dass durch die Bewegungen der Maus eine höhere Belastung auf das intramuskuläre Implantat, welches direkt im Oberschenkelmuskel lokalisiert war, ausgeübt wurde als auf das subkutane Implantat. In einigen Präparaten kam es außerhalb des Knochengewebes zusätzlich zur Bildung von kleinen Blutgefäßen (Abbildung 45 c). Angiogenese spielt eine wichtige Rolle während der enchondralen Knochenbildung (Gerber, H.P. et al., 1999; Yang X., et al., (1999). Außerdem fördert sie das Knorpel-Remodeling und die Ausbildung in Knochen (Gerber et al., 1999). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass Zusammenhänge zwischen den Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie wie GDF-5 und der Angiogenese existieren und dass Smad5, ein Signaltransduktionsmolekül von BMP2, in der Angiogenese involviert ist (Yamashita, H. et al., 1997). Diese Kenntnisse über die Funktion der Angiogenese in der enchondralen Knochenbildung haben Moutsatsos et al. (2001) dazu veranlasst, das angiogene Verhalten von rhBMP-2 zu untersuchen. Sie konnten zeigen, dass rhBMP-2 für die Bildung von Blutgefäßen mitverantwortlich ist. Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Bildung der Blutgefäße in den intramuskulären Smad8 L+MH2 und BMP2-Gewebeproben ebenfalls auf das BMP2 zurückzuführen ist. Die Bildung des Knochengewebes in der Nähe der Blutgefäße steht somit auch im Zusammenhang der Angiogenese. Ein direkter Übergang vom Knochengewebe in die sehnensähnlichen Strukturen ist nur in Ansätzen zu erkennen. Möglicherweise hätte sich bei einer Implantationszeit von mehr als vier Wochen ein kompletter Knochen-Sehnen-Übergang gebildet, allerdings ohne eine Knorpel-Interphase. Durch eine human-spezifische  $\beta$ 2-Antikörper-Färbung der humanen MSCs konnte gezeigt werden, dass die modifizierten und implantierten huMSCs im neu gebildeten sehnensähnlichen Gewebe lokalisiert waren (Abbildung 46).

Da in den BMP2-Implantaten keine Sehnenstrukturen beobachtet werden konnten, kann somit als Fazit geschlossen werden, dass Smad8 L+MH2 für die Bildung der sehnensartigen Strukturen ausreichend ist. Es zeigte sich, dass sowohl adenoviral-infizierte murine als auch lentiviral-modifizierte humane mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, in Richtung Tendogenese zu differenzieren. Bei den adenoviral-modifizierten C3H10T1/2-Zellen konnte bereits nach vier Wochen ein vollständiger Knochen-Sehnen-Übergang generiert werden. Die

lentiviral-infizierten humanen MSCs benötigen vermutlich länger, um einen derartigen Übergang zu bilden.

### 5.6 Screening nach Faktoren, die in der Sehnenbildung eine Rolle spielen könnten

Es ist bekannt, dass die mesenchymale Vorläuferzelle faktorabhängig in diverse Geweberichtungen differenzieren kann. Wie aus den Abschnitten 4.1 und 4.2 hervorgeht, ist die rekombinant exprimierende C3H10T1/2<sup>Smad8 L+MH2/BMP2</sup>-Zelllinie in der Lage, in Richtung Tendogenese zu differenzieren. Um zu untersuchen, welche Faktoren in dieser Zelllinie während der Bildung von sehnenartigem Gewebe exprimiert werden, wurde eine Microarray-Analyse wie unter 4.7 beschrieben durchgeführt. Mit Hilfe dieser Analyse sollten Faktoren gefunden werden, welche in der Sehnenentwicklung eine Rolle spielen könnten. Dabei wurde vor allem nach Proteinen gesucht, die zu einem frühen Zeitpunkt während der Differenzierung reguliert wurden. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass das Smad8 L+MH2/BMP2-Signalsystem für die Synthese von sekretierten Matrixkomponenten verantwortlich sein könnte, die an der Ausbildung einer geordneten Kollagenstruktur und extrazellulärer Matrix beteiligt sind.

Es zeigte sich, dass 2990 Gene BMP2-abhängig und 1950 Gene Smad8 L+MH2/BMP2-abhängig differentiell exprimiert wurden. Für die Auswahl des sekretierten Faktors war vor allem der Expressionsverlauf relevant. Das Gen Periostin zeigte einen interessanten Expressionsverlauf und wurde daher näher untersucht (Tabelle 10): Periostin wurde im Smad8 L+MH2/BMP2-Hintergrund am 7. Tag um das 28,5-fache im Vergleich zu Tag 0 exprimiert und ging bis zum letzten Tag der Kinetik auf einen Wert von 17,9 zurück. In den BMP2-Zellen wurde Periostin am 7. Tag um das 11,6-fache im Vergleich zu Tag 0 exprimiert, viel bis zum 17. Tag aber auf einen Wert von 0,85 ab. Der Vergleich dieser beiden Zelllinien zeigte deutlich, dass Periostin im Zusammenhang mit Smad8 L+MH2 steht und womöglich auch einen Einfluss auf die Sehnendifferenzierung ausübt. Für die Charakterisierung von Periostin wurden zunächst die Ergebnisse des Microarrays experimentell auf Protein- und RNA-Ebene verifiziert. Der Nachweis des endogenen Periostins in den Proteinproben der Differenzierungsstudie zeigte, dass das Protein im Smad8 L+MH2/BMP2-Hintergrund am 10. Tag am höchsten exprimiert wird und nicht, wie aus der Microarray Analyse hervorgeht, bereits am 7. Tag sein Expressionsmaximum erreicht hat (Abbildung 48). Die Periostin-Expression in den BMP2-Zellen entsprach den Microarray Daten. Da beim Microarray mit RNA-Proben und beim Western Blot mit Proteinen gearbeitet wurde, müssen die Ergebnisse auch nicht notwendigerweise vollständig korrelieren. Auffällig war jedoch, dass sowohl der Nachweis von Periostin mittels Northern Blot (Abbildung 49) als auch die Ergebnisse der Real-Time PCR (Abbildung 50) zeigten, dass die Expression von Periostin ebenfalls erst am 10. Tag der Differenzierung am höchsten war. Die Expressionshöhe von Periostin in den C3H10T1/2<sup>BMP2</sup>-Zellen stimmte hingegen sowohl im Northern Blot als auch bei der Real Time PCR mit den Ergebnissen des Microarrays überein. Laut Literatur lassen sich Microarray-Daten oft nicht durch Real-Time PCR bestätigen, da diese Methode sehr sensitiv ist. Dadurch kommen die unterschiedlichen Expressionshöhen an den Tagen 7 und 10 zustande. Die Ergebnisse zeigten jedoch eindeutig, dass Periostin in den BMP2/Smad8 L+MH2-exprimierenden C3H10T1/2-Zellen im Vergleich zu den BMP2-exprimierenden Zellen im Verlauf der Kinetik induziert wurde. Dieses Ergebnis bildete die Grundlage für eine weitere Charakterisierung von Periostin.

Im Jahr 1999 wurde das Protein Periostin aus der MC3T3-E1 cDNA Bibliothek isoliert und als ein osteoblast-spezifischer Faktor angesehen (Horiuchi et al., 1999). Es handelt sich dabei um ein sekretiertes Zell-Adhäsionsprotein, dass homolog zu den Fascilin I – Wachstumsfaktor in Insekten ist (Meyer et al., 1995 und Kruzynska-Frejtag et al., 2004) und über deren

Funktion bisher kaum etwas bekannt ist. Es wird angenommen, dass es sich bei Periostin um ein Zell-Adhäsionsmolekül während der Knochenbildung handelt, welches die Anheftung und Migration von osteoblasten Zelllinien fördert (Horiuchi et al., 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Periostin-Expression im Neuroblastom (Sasaki et al., 2002), bei Eierstockkrebs (Gillian et al., 2002) und im Lungenkarzinoma (Sasaki et al., 2002) gefunden wurde, die einer epithelial-mesenchymalen Transformation und einer Metastasierung ausgesetzt waren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Periostin das metastatische Wachstum von Darmkrebs durch Erhöhung der Zellrate über den PI3K/Akt-Signalweg fördert (Bao et al., 2004). Außerdem wird Periostin mit der Entwicklung des Herzens in Verbindung gebracht. Nach einem myokardinalen Infarkt ist Periostin für die Ablagerung der extrazellulären Matrix (Stanton et al., 2000) und für die ventrikuläre Erweiterung verantwortlich (Katsuragi et al., 2004). Um die Rolle von Periostin während der Embryogenese zu untersuchen, wurden Periostin-knock-out Mäuse hergestellt (Rios et al., 2005). Das Periostin-Gen wurde durch das lacZ-Reportergen ersetzt. Überraschenderweise zeigte sich, dass, obwohl Periostin in vielen Organen während der Embryogenese exprimiert wird, Periostin-defiziente Mäuse normal gewachsen sind. Postnatal sind jedoch ca. 14% der Null-Mäuse gestorben. Diejenigen, die überlebt haben, blieben jedoch in ihrer Entwicklung zurück. Untersuchungen des Skeletts zeigten, dass der trabekuläre Knochen in den homozygoten adulten Mäusen zu kurz war, die restlichen Knochen jedoch keine Auswirkungen erlitten. Nach drei Monaten entwickelten die Periostin-Null-Mäuse peridontale krankheits-ähnliche Phänotypen. Obwohl es keine Änderungen in der Differenzierung von Ameloblasten (schmelzbildende Zellen) gab, zeigten diese Mäuse auch einen massiven Schneidezahn-Emaildefekt. Als die Periostin-defizienten Mäuse auf eine spezielle Diät gesetzt wurden, die die mechanische Beanspruchung des peridontalen Ligaments (dünnes, fibroses Band, das die Zähne mit dem Knochen verbindet) reduzierte, verringerte sich auch der Emaildefekt. Ebenfalls wurden die peridontalen krankheits-ähnlichen Phänotypen schwächer. Diese Untersuchungen haben somit gezeigt, dass Periostin für ein gesundes peridontales Ligament notwendig ist und dass Periostin ebenfalls erforderlich ist für die Erhaltung der Unversehrtheit des Ligaments als Antwort auf mechanischen Stress. Neueste Untersuchungen, in denen das Verhalten von Periostin in Bindegewebe untersucht wurden, zeigten auch, dass das Protein die Kollagenfibrillogenese und die biomechanischen Eigenschaften von Bindegewebe reguliert (Norris et al., 2007).

### **5.7 Differenzierungsstudie von LV-Periostin-/LV-BMP2- und LV-Periostin-infizierten C3H10T1/2-Zellen**

Um den Einfluss von Periostin auf die Differenzierung in Sehnenzellen untersuchen zu können, wurden C3H10T1/2-Zellen entweder nur mit den lentiviralen Vektoren Periostin oder BMP2 infiziert, oder es erfolgte eine Ko-Infektion von Periostin mit BMP2. Als Kontrolle und um die Infektionseffizienz der Zellen abschätzen zu können, wurden C3H10T1/2-Zellen ebenfalls mit dem Lentivirus GFP infiziert. Die Zeitpunkte der Differenzierungsstudie wurden so gewählt, dass sie mit den Ergebnissen der Microarray-Analyse verglichen werden konnten. Die Regulation der Expression der lentiviral eingebrachten Gene erfolgte über das in 3.6.4 beschriebene Tet-On System, wobei eine Expression der Transgene in Abwesenheit von Doxycyclin reprimiert und in Gegenwart von Doxycyclin induziert wird. Über den gesamten Zeitraum der Studie wurde eine konstante Genexpression durch Zugabe von Doxycyclin zum Medium gewährleistet. Es folgte eine morphologische Analyse der Zellen sowie die Untersuchung der Expression bestimmter Markergene.

Die morphologische Analyse (Abbildung 51) und die histologische Anfärbung der modifizierten Zellen mit Alkalischer Phosphatase zeigten keine Besonderheiten in Hinsicht auf die Differenzierung in Sehnenzellen. Durch Anfärbung der Zellen mit Alkalischer Phosphatase zeigte sich lediglich, dass diejenigen Zellen, die BMP2 allein oder als

zusätzlichen Faktor exprimierten, in Osteoblasten differenzierten (Daten nicht dargestellt). Ein Einfluss von Periostin beziehungsweise von Periostin und BMP2 in Richtung Tendogenese konnte *in vitro* nicht festgestellt werden. Sowohl die zusätzlichen Faktoren exprimierenden Zellen als auch die Kontrollzellen entwickelten sich morphologisch ähnlich. Wie unter 5.3 erwähnt wird zur Ausbildung von Sehnenzellen ein gerichteter Zug benötigt. Dieser war jedoch in der *in vitro* Studie nicht gegeben. Es könnte ein möglicher Grund sein, warum die Periostin-infizierten C3H10T1/2-Zellen nicht in Sehnenzellen differenzierten. Des Weiteren lag die Infektionsrate bei ungefähr 65%. Möglicherweise haben die murinen Stammzellen zu wenig der lentiviralen Expressionskonstrukte aufgenommen, so dass ein Einfluss der Faktoren nicht möglich war.

Dennoch wurde die Genexpression bestimmter Markergene mit Hilfe von RT-PCR-Analysen untersucht (Abbildung 52). Die Expression des putativen Sehnenmarker *EphA4* fand nur in den Periostin- bzw. Periostin-/BMP2-infizierten C3H10T1/2-Zellen statt. Bereits am 7. Tag wurde der Transkriptionsfaktor exprimiert, wobei ein verstärkter Effekt in Anwesenheit von BMP2 auftrat. Die Expressionshöhe nahm über den Differenzierungszeitraum zu. In den Kontrollzellen hingegen konnte keine *EphA4*-Expression beobachtet werden. Dieser Verlauf deutete darauf, dass eventuell doch eine Differenzierung der Periostin-infizierten Zellen in Richtung Tendogenese stattgefunden hat und dass BMP2 den Einfluss verstärkt.

Einen Hinweis auf eine mögliche stattgefundene Differenzierung in Tenozyten lieferte auch das Expressionsverhalten vom Markergen *Tenomodulin*. Sowohl in den Kontroll- als auch in Zellen mit BMP2-Hintergrund war nur eine minimale *Tenomodulin*-Expression zu erkennen. In den Periostin- als auch in den Periostin- und BMP2-modifizierten mesenchymalen Stammzellen konnte eine erhöhte Expression von *Tenomodulin* ab dem 10. Tag festgestellt werden, die bis zum Ende der Kinetik noch anstieg. Erneut verstärkte BMP2 den Effekt. Wie bereits erwähnt, übernimmt *Tenomodulin* eine wichtige Rolle bei der Tenozyten-Proliferation (Docheva et al., 2005). Auch wenn morphologisch keine Effekte sichtbar waren, deutet die Expression des Transmembran-Glykoprotein darauf hin, dass Periostin einen Einfluss auf die C3H10T1/2-abhängige Sehnenzellbildung hat.

*Kollagen Typ I* sowie *Kollagen Typ II* wurden wie erwartet über den gesamten Zeitraum in allen modifizierten Zellen mehr oder weniger exprimiert und können somit keine Rückschlüsse auf eine stattgefundene Differenzierung der murinen mesenchymalen Stammzellen in die Sehnenrichtung geben.

Wie schon die vorherigen *in vitro* Studien zeigte auch diese, dass trotz fehlender morphologischer Veränderungen in Tenozyten, eine Markengenanalyse Hinweise auf eine mögliche stattgefundene Differenzierung in Richtung Tendogenese geben kann. *Tenomodulin* und *EphA4* zeigten im Periostin-Hintergrund ein für Sehnenzellen typisches Expressionsmuster. Weitere Aufschlüsse über Periostin sollten *in vivo* Analysen geben.

## **5.8 Implantation von LV-Periostin-/LV-caBMPR-IA- und LV-Periostin-modifizierten murinen Stammzellen in C3H/HeN-Mäuse**

*In vivo* Untersuchungen von Periostin haben gezeigt, dass das Protein eine Rolle in der Kollagenfibrillogenese und somit auch in der Entwicklung von Bindegewebe ausübt (Norris et al., 2007). Um zu prüfen, ob Periostin auch in der Entwicklung von Sehnen involviert ist, wurden zunächst Implantationen von lentiviral-modifizierten C3H10T1/2-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die murinen mesenchymalen Stammzellen mit dem Lentivirus Periostin infiziert. Anstelle vom sekretorischen BMP2 wurde bei diesen Versuchen mit dem konstitutiv aktiven BMP-Rezeptor-IA gearbeitet. Da in den vorherigen Implantationen der BMP2-Effekt massiv war, sollte dieser durch den caBMPR-IA ersetzt werden. Der Rezeptor vermittelt BMP-Signale, die aber im Gegensatz zum sekretierten BMP2 nur in infizierten Zellen erfolgt.

Es wurde eine Doppelinfektion der C3H10T1/2-Zellen mit Periostin und caBMPR-IA sowie Einzelinfektionen mit dem jeweiligen Viruskonstrukt vorgenommen. Zur Kontrolle der Infektionseffizienz wurden alle Zellen zusätzlich mit GFP infiziert (siehe Tabelle 14). Ähnlich wie bei der Infektion der C3H10T1/2-Zellen für die *in vitro* Differenzierungsstudien betrug die Expressionseffizienz nach 4 Tagen ungefähr 70% (Abbildung 53). Nach längerer Kultivierung und nach Zugabe von Doxycyclin erhöhte sich aber die Expressionseffizienz. Da bei *in vivo* Analysen dem Trinkwasser der Mäuse bereits einige Tage vor der Operation Doxycyclin zugefügt wurde, konnte sich das Antibiotikum vollständig im Gewebe der Maus verteilen und war somit zum Zeitpunkt der Implantation der modifizierten Zellen präsent. Die Tet-regulierte Expression von Periostin und caBMPR-IA konnte somit gleich stattfinden.

Nach einer vierwöchigen Implantationszeit wurden die Gewebepreparate entnommen. Der erste visuelle Eindruck zeigte, dass die modifizierten murinen Stammzellen in Gewebe differenzierten. Die Präparate waren in ihrer Farbe weiß und elastisch und zeigten somit typische Merkmale von Sehnenmaterial. Im Gegensatz zu den vorherigen Implantationen mit BMP2 konnte dieses Mal keine massive Verhärtung des Gewebes beobachtet werden. Da zum Zeitpunkt der Explantation keine Blutgefäße im Gewebe sichtbar waren, konnte vorerst auch keine Aussage über eine mögliche abgelaufene Angiogenese getroffen werden.

Kollagenschwämme, die nur mit GFP-modifizierten C3H10T1/2-Zellen implantiert wurden, zeigten keine morphologischen Besonderheiten und ähnelten dem Originalschwamm (Abbildung 54). Murine mesenchymale Stammzellen, die mit caBMPR-IA infiziert und implantiert wurden, differenzierten wie erwartet in knorpelartige Strukturen (Daten nicht dargestellt).

Periostin-infizierte und implantierte C3H10T1/2-Zellen zeigten bei Anfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (Abbildung 55 a) und Trichrom-Masson-Goldner (Abbildung 56 a und b) neben der Ausbildung von gerichteten Kollagenfasern auch Fibrozyten (FZ), die sich mit den Kollagenfasern „einmauerten“. Die Zellen verliefen zum Teil wellenförmig und besaßen eine längliche Morphologie. Der Verlauf der Zellen erinnerte an Tenozyten, jedoch wurden diese wellenförmigen Strukturen nur in wenigen Bereichen in der Gewebeprobe beobachtet, so dass an dieser Stelle nicht eindeutig von einer Differenzierung der Periostin-infizierten C3H10T1/2-Zellen in sehn-ähnliches Gewebe gesprochen werden kann (Abbildung 56a). Dennoch wird der Eindruck vermittelt, dass Periostin einen Einfluss auf die Differenzierung der murinen Stammzellen ausübt.

C3H10T1/2-Zellen, die neben Periostin noch mit caBMPR-IA infiziert wurden, zeigten nach Anfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (Abbildung 55 b und c) sowohl eine Differenzierung in Knorpel (Kn)- als auch in Knochengewebe (K), welches zum Teil schon mineralisiert war. Durch die Anwesenheit von caBMPR-IA wurde dieser Effekt auch erwartet. In verschiedenen intramuskulären Präparaten konnte aber auch die Bildung von Fibrozyten (FZ) und sehn-ähnlichem Gewebe (S) beobachtet werden (Abbildung 56 b und d). Anfärbungen der Gewebeproben mit Trichrom-Masson-Goldner (Abbildung d) zeigten, dass sich neben dem Knorpelbereich mit den proliferierenden Knorpelzellen (PKn) eine Struktur entwickelte, die Sehngewebe (S) ähnelte. Die Zellen dieses Bereiches hatten einen gerichteten und parallelen Verlauf und besaßen das sehn-typische „crimp-pattern“. Auffallend war, dass die verschiedenen Zellbereiche ineinander übergingen. Das neu gebildete Gewebe ähnelte den Ergebnissen der Implantationsstudie mit Smad8 L+MH2 und BMP2-adenoviral modifizierten C3H10T1/2-Zellen. In beiden Fällen konnte ein direkter Übergang von Knochen- bzw. Knorpelgewebe in sehn-ähnliches Gewebe beobachtet werden.

Zusammenfassend bleibt somit festzuhalten, dass die Implantationen und Analysen von Periostin-modifizierten C3H10T1/2-Zellen keine eindeutigen Hinweise auf eine stammzell-

abhängige Differenzierung in sehnen-ähnliches Gewebe lieferten. Bei Implantationen, die mit Periostin- und caBMPR-IA-modifizierten C3H10T1/2-Zellen durchgeführt wurden, konnte bei anschließender Analyse hingegen Knorpelgewebe und sehnen-ähnliche Strukturen erkannt werden. Die Ausbildung von Knochengewebe konnte nicht festgestellt werden. Erneut konnten in den intramuskulären Präparaten stärker ausgeprägte Strukturen beobachtet werden. Der Implantationsort hatte somit einen Einfluss auf die Differenzierung der modifizierten Zellen.

Ein Nachweis der modifizierten C3H10T1/2-Zellen im neu gebildeten Gewebe konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr durchgeführt werden. Da aber sowohl die Kontrollzellen als auch die C3H10T1/2-Zellen, die mit Periostin oder mit caBMPR-IA allein infiziert wurden, nicht in sehnenartige Strukturen differenzierten, kann angenommen werden, dass an der Bildung des sehnen-ähnlichen Gewebes sowohl Periostin als auch caBMPR-IA beteiligt sind.

### **5.9 Implantationen von LV-Periostin- und LV-Periostin-/caBMPR-IA-modifizierten humanen mesenchymalen Stammzellen in Nacktmäuse**

In der regenerativen Medizin kommen häufig humane mesenchymale Stammzellen zum Einsatz. Daher wurden hier ebenfalls *in vivo* Analysen von modifizierten huMSCs durchgeführt. Die Zellen wurden zum einen mit dem lentiviralen Konstrukt Periostin und zum anderen mit den beiden Konstrukten Periostin und caBMPR-IA infiziert und in Nacktmäuse implantiert (siehe 4.11). Zur Kontrolle dienten uninfierte und GFP-infizierte huMSCs.

Sowohl die Hämatoxylin und Eosin-Färbungen von GFP-infizierten als auch von den uninfierten huMSCs zeigten keine auffälligen morphologischen Strukturen (Abbildung 58). Ebenfalls zeigten Präparate, die nur mit dem Lentivirus Periostin infiziert wurden, keine Differenzierung in eine besondere Richtung (Daten nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu differenzierten Periostin- und caBMPR-IA-infizierte huMSCs in sehnen-ähnliches Gewebe (Abbildung 59). An mehreren Stellen konnte das sehnenspezifische „crimp-pattern“ beobachtet werden. Die Zellen waren lang gezogen und besaßen eine wellenförmige Struktur. Der Verlauf der Zellen war gerichtet und parallel. Interessant war, dass diese stark ausgeprägte sehnenartige Struktur in einem subkutanen Präparat vorgefunden wurde. Bei der Explantation dieses Schwammes wurde dieser aber auch nicht an seinem Implantationsort vorgefunden, sondern lag auf dem Rückgrat der Maus und war leicht mit dem umliegenden Gewebe verwachsen. Durch die Bewegungen der Maus war der Kollagenschwamm ähnlichen Belastungen wie ein intramuskuläres Implantat ausgesetzt. Weiterhin war auffällig, dass die neu gebildeten sehnen-ähnlichen Strukturen nicht innerhalb, sondern außerhalb des Gewebepreparates lokalisiert waren.

### **5.10 Nachweis der implantierten humanen mesenchymalen Stammzellen im neu gebildeten Sehnengewebe**

Um zu prüfen, ob die lentiviral infizierten huMSCs mit Periostin und caBMPR-IA an der Bildung des sehnen-ähnlichen Gewebes beteiligt waren, wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern durchgeführt. Frühes Sehnengewebe besteht überwiegend aus *Kollagen Typ III*, wohingegen in ausgereiften Sehnen der *Kollagen Typ I*-Anteil überwiegt. Da es sich bei den Ergebnissen dieser Implantationen um neues Sehnengewebe handelte, ist ein Nachweis von *Kollagen Typ III* im neu gebildeten Gewebe sinnvoll. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem Lentivirus GFP infiziert, es konnte daher ein indirekter Nachweis über eine GFP-Antikörperfärbung stattfinden.

Um eine bessere Übersicht über die Präparate zu bekommen, wurden die gefärbten Gewebestücke in 13 Zonen unterteilt (Abbildung 60). Es zeigte sich, dass sowohl in Zone 10



als auch in 12 größere Bereiche des „crimp-pattern“ zu beobachten waren. In den Zonen 11 und 13 konnten kleiner Bereiche mit sehnartigen Gewebe festgestellt werden. All diese Zonen lagen außerhalb des Kollagenschwammes. Die Anfärbung des Paraffinschnittes mit dem GFP-Antikörper zeigte, dass sich die GFP-infizierten huMSCs innerhalb der Gewebeprobe befanden und nicht im neu gebildeten Gewebe. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil der implantierten huMSCs am Rand des Gewebestückes lokalisiert war. Im Zentrum der Gewebeprobe konnten nur wenige Zellen angefärbt werden. Die immunhistochemische Färbung des Paraffinschnittes mit einem *Kollagen Typ III*-Antikörper zeigte, dass sowohl Bereiche im Präparat als auch im sehnartigen Gewebe positiv waren. Die Eigenfluoreszenz des Kollagenschwammes musste jedoch berücksichtigt werden. Da diese in ihrer Rotfärbung aber schwächer war als im Vergleich zu den übrigen Bereichen, konnte das neu gebildete Gewebe eindeutig vom Kollagenschwamm unterschieden werden.

Bei Periostin handelte es sich um einen sekretierten Faktor. Es wurde der Eindruck vermittelt, dass das von den humanen mesenchymalen Stammzellen exprimierte und sekretierte Periostin in das umliegende Mausgewebe diffundierte und dort Signalwege stimulierte, die die Sehnenzellbildung induzierten. Wie in der Einleitung unter Punkt 1.5 erwähnt, können sowohl autokrine als auch parakrine Effekte bei der Differenzierung von Zellen eine Rolle spielen. Als parakrine Sekretion wird der Sekretionsmodus von Zellen bezeichnet, bei dem die abgegebenen Substanzen direkt auf Zellen in der unmittelbaren Umgebung wirken. Bei einer autokrinen Sekretion hingegen wirken die abgegebenen Faktoren auf die absondernde Zelle selbst. Bei den Implantationsversuchen mit Periostin- und caBMPR-IA-infizierten huMSCs wurde das rekombinante Periostin vermutlich von den implantierten humanen Stammzellen sekretiert und übte dann einen Einfluss auf die umliegenden Wirtszellen aus. Es handelte sich somit um einen parakrinen Effekt, bei dem die durch Periostin stimulierten Mauszellen in Tenozyten differenzierten. Eine stark ausgeprägte Differenzierung in Sehnengewebe konnte aber nur in Implantationen beobachtet werden, die zusätzlich zum Lentivirus Periostin noch mit dem konstitutiv aktiven BMPR-IA infiziert wurden.

Einen eindeutigen Nachweis, dass Periostin im neu gebildeten Gewebe lokalisiert und somit an der Bildung des sehn-ähnlichen Gewebes beteiligt ist, würde ein immunhistochemischer Nachweis mit einem human-spezifischen Periostin-Antikörper liefern. Erste Färbungen wurden bereits durchgeführt. Da dieser Antikörper jedoch nur schwer paraffin-zugänglich ist, konnte bisher kein positiver Nachweis protokolliert werden. Insgesamt haben die Implantationsversuche mit Periostin/caBMPR-IA-modifizierten C3H10T1/2-Zellen und humanen MSCs jedoch gezeigt, dass Periostin eine Rolle in der Sehnententwicklung übernehmen könnte. Wie bereits erwähnt konnte in Periostin-knockout-Mäusen gezeigt werden, dass das Protein an der Ausbildung eines stabilen peridontalen Ligamentes beteiligt ist (Rios et al., 2005). Es wäre somit ebenfalls möglich, dass Periostin für die Bildung einer stabilen Sehne notwendig ist.

Zusammenfassend bleibt nach den durchgeführten Untersuchungen festzuhalten, dass sowohl Smad8 L+MH2 als auch Periostin eine funktionelle Rolle bei der Entwicklung von Sehnen übernehmen. In den *in vitro* als auch *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass Smad8 L+MH2- und Smad8 L+MH2/BMP2-modifizierte murine als auch humane mesenchymale Stammzellen in der Lage waren, in sehn-ähnliche Strukturen zu differenzieren. Der sekretierte Faktor Periostin, der während der Differenzierung von C3H10T1/2<sup>BMP2/Smad8 L+MH2</sup>-Zellen hoch exprimiert wurde, scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen und huMSCs in Richtung Tendogenese auszuüben.

## 6 Zusammenfassung

Über die Entwicklung von Sehnen- und Bändern ist relativ wenig bekannt. Vorausgegangene Untersuchungen ergaben, dass es bei einer Überexpression von Smad8 L+MH2 und BMP2 in der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T1/2 zu einer Differenzierung in Sehnenzellen kam. Diese Erkenntnisse lieferten die Grundlage für die vorliegende Doktorarbeit.

Zunächst zeigte die Analyse der Markergene *Scleraxis*, *EphA4* und *Six2* während der Differenzierung von rekombinant BMP2- und Smad8 L+MH2-exprimierenden C3H10T1/2-Zellen, dass Smad8 L+MH2 die Sehnenentwicklung förderte. Zur Untersuchung der Differenzierung modifizierter muriner Stammzellen *in vivo* wurde ein ektopes Mausmodell für eine Sehnenbildung entwickelt. Die Analyse von Implantaten mit modifizierten Stammzelllinien zeigte, dass BMP2 und Smad8 L+MH2 die Tendogenese ermöglichen.

Bei einer Gentherapie werden oft retrovirale- oder adenovirale Vektoren eingesetzt. Daher wurde auch das Differenzierungsverhalten mit zunächst adenoviral-modifizierten C3H10T1/2-Zellen untersucht. Die Analyse von Markergenen deutete daraufhin, dass Smad8 L+MH2 und BMP2 auch mit adenoviraler Expression in der Lage sind, stammzellabhängig sehnen-ähnliches Gewebe zu bilden. Ektople Implantationen dieser adenoviral-veränderten C3H10T1/2-Zellen zeigten, dass *in vivo* eine Differenzierung der Zellen sowohl in sehnen-ähnliches Gewebe als auch in Knochen stattfindet. Überraschenderweise kam es zur Generierung eines apophysären Knochen-Sehnen-Übergangs. Eine stammzellabhängige Bildung solch eines Knochen-Sehnen-Überganges wurde bisher noch nicht gezeigt. Im Gegensatz dazu bildete sich in C3H10T1/2-Zellen die nur Smad8 L+MH2 exprimierten, sehnen-ähnliches Gewebe ohne Knochenelemente. Dies zeigt, dass eine Smad8 L+MH2-abhängige Signalvermittlung für eine Sehnenzellbildung ausreichend ist.

Es wurden auch lentiviral-infizierte humane mesenchymale Stammzellen ektopisch in Mausgewebe implantiert. Auch hier konnte eine Smad8 L+MH2/BMP2-abhängige Differenzierung in Knochen- und sehnen-ähnliches Gewebe beobachtet werden. Es waren ebenfalls Knochen-Sehnen-Übergänge, aber offensichtlich ohne eine Knorpel-Interphase, zu erkennen. Durch Behandlung der Gewebeproben mit einem human-spezifischen  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörper konnten die implantierten humanen Stammzellen im neu gebildeten Knochen- und Sehnen Gewebe nachgewiesen werden.

Eine Arbeitshypothese war, dass sekretierte Faktoren für die Ausbildung der geordneten Kollagenstruktur in Sehnen verantwortlich sind. Daher wurde mit Hilfe einer Microarray Analyse ein Screening nach sekretierten Faktoren durchgeführt. Es zeigte sich, dass unter mehreren sekretierten Genprodukten auch der Faktor Periostin im Smad8 L+MH2/BMP2-Hintergrund zu einem frühen Zeitpunkt während der Differenzierung hoch reguliert wurde.

*In vitro* Analysen von lentiviral-infizierten C3H10T1/2-Zellen mit Periostin und Periostin/BMP2 ergaben zunächst keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Tendogenese. Bei Implantation von Periostin- und caBMPR-IA-modifizierten murinen als auch humanen mesenchymalen Stammzellen konnte jedoch beobachtet werden, dass in beiden Fällen eine stammzellabhängige Differenzierung in sehnen-ähnliches Gewebe stattfand. Bei den modifizierten humanen Stammzellen wurde die Bildung des neuen Gewebes allerdings außerhalb der implantierten Trägermatrix beobachtet. Es wird daher vermutet, dass die humanen Stammzellen Periostin in das umliegende Mausgewebe sekretieren und dieses dort die Organisation der extrazellulären Matrix in sehnen-ähnliches Gewebe einleiten kann.

Mit dieser Doktorarbeit konnte zum ersten Mal die ektope Bildung eines Knochen-Sehnen-Überganges gezeigt werden. Des Weiteren gelang durch die Implantation von Smad8 L+MH2-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen auch die Bildung von sehnenähnlichem Gewebe. Diese Untersuchungen könnten langfristig einen Beitrag zur regenerativen Therapie von Sehnendefekten liefern.

## 7 Anhang

### 7.1 Geräte

Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5417R Heraeus Biofuge pico Heraeus Megafuge 1.0R Sorvall RC5C Beckmann Ultrazentrifuge TL-100
PCR-Apparatur:	Applied Biosystem GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 2400 Applied Biosystem GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 9700
Light Cycler:	Version 2.0, Roche
Geldokumentation:	PHASE GelCam
Photometer:	Amersham pharmacia biotech Ultraspec <sup>®</sup> 3100 pro mit DPU-414 Thermal Printer
Sterilbank:	Heraeus LaminAir <sup>®</sup> HLB 2472
Mikroskope:	Leitz Labovert FS (Lichtmikroskop) mit Intas 3-Chip-Farb-Video-Kamera Zeiss Axiovert S100 (Fluoreszenzmikroskop) mit Leica Digitalkamera DC200 Zeiss Axioplan (Fluoreszenzmikroskop) mit MPEG Movie Ex
Zellkulturinkubatoren:	Heraeus CO2-Auto-Zero Labotec Inkubator C200
Elektrotransformationsapparatur:	Bio-Rad Gene Pulser
Elektrophoresekammer:	Horizon <sup>™</sup> 11-14 Horizontal Gel Electrophoresis System, Gibco BRL (Agarosegele) Biometra Electrophorese Minigel Twin G42 (SDS-Gele)
Netzgeräte:	Bio-Rad PowerPac 200 Bachhofer Laboratoriumsgeräte 7410 Reutlingen
Entwicklermaschine:	Agfa, Curix 60
Sequenzierapparatur:	ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Schweißapparatur:	Beckmann

### 7.2 Verbrauchsmaterialien

Glasgefäße:	Sarstedt-Reaktionsgefäße
Plastikgefäße:	Greiner
Zellkulturgefäße:	Nunc
Sterilfilter:	Millipore, Steritop, 0,22µm GPEXpressmembran
Kollagenschwamm:	Duragen

Die übrigen eingesetzten Geräte und Materialien gehören zur Standard-Laboraausstattung und zeigen keinen relevanten Einfluss auf den Verlauf oder die Dokumentation von durchgeführten Experimenten.

### 7.3 Enzyme und Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Bio-Rad, Boehringer, Fluka, Gibco BRL, Merck, Pharmacia, Reidel-de-Haen, Roche, Roth, Seromed, Serva und Sigma verwendet. In der Tabelle 16 sind die verwendeten Enzyme aufgeführt.

**Tabelle 16:** Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase	Promega
Herculase <sup>®</sup> Enhanced DNA Polymerase	Stratagene
M-MLV Reverse Transkriptase	Life Technologies Gibco BRL
PfuTurbo <sup>®</sup> DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonuklease <i>Bam</i> HI	Biolabs
Restriktionsendonuklease <i>Hind</i> III	Biolabs
Restriktionsendonuklease <i>Mlu</i> I	Biolabs
Restriktionsendonuklease <i>Sal</i> I	Biolabs
RNasin <sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor	Promega
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	USB
T4 DNA-Ligase	Promega

### 7.4 Kits

**Tabelle 17:** Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Complete Mini-Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche
dNTPs	Amersham Biosciences
ECL-Plus <sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
ECL <sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
High Pure PCR-Product Purification Kit	Roche
JETSTAR Novel Plasmid Purification System	GENOMED
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Life Technologies Gibco BRL
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Bradford Proteinbestimmung)	Bio Rad
Sequenzierungskit	Applied Biosystems
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	Roche
Full Range Rainbow Molecular Weight Markers	Amersham Biosciences
GeneRuler <sup>™</sup> 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas
Lambda DNA/ <i>Eco</i> RI+ <i>Hind</i> III Marker, 3	MBI Fermentas

## 7.5 Oligonukleotidprimer

Die verwendeten murinen Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

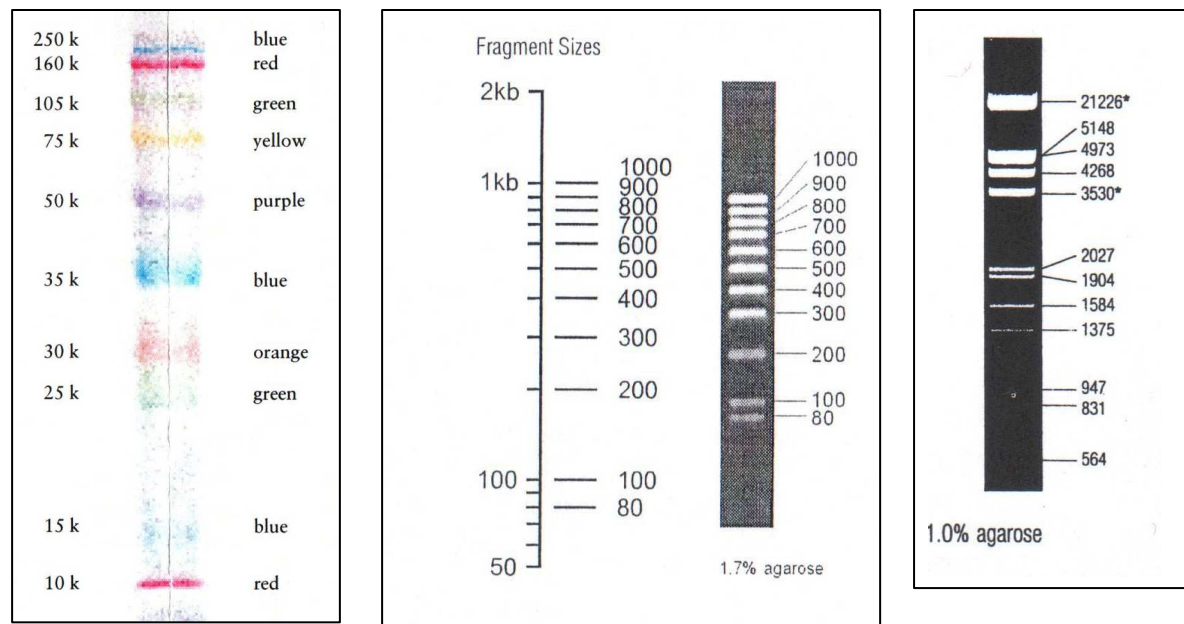
**Tabelle 18:** Verwendete murine Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
Plox Fwd	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTG	Nachweis Vektor pLox Klonierung
Plox Rev	GTTAAGAATACCAGTCAATCTTTCAC	Nachweis Vektor pLox Klonierung
pShuttle Fwd	GCTAACTAGAGAACCCACTGC	Nachweis Vektor pShuttle Klonierung
pShuttle Rev	CAATGCGATGCAATTTCCTC	Nachweis Vektor pShuttle Klonierung
HPRT 5.3	TCAACGGGGGACATAAAA	Nachweis HPRT
HPRT 3.3	ATTCAACTTGCCTCATCTT	Nachweis HPRT
Col 1 A1 3'	TTTTTGTAAGGTT GAATGC	Nachweis Kollagen 1
Col 1 A1 5'	GCCCTGCCTGCTTCGTG	Nachweis Kollagen 1
Col 2 A1 5'	CCTGTCTGCTTCTTGTA AAC	Nachweis Kollagen 2
Col 2 A1 3'	AGCATCTGTAGGGGTCTTCT	Nachweis Kollagen 2
OSTCAL 5'	CCAGACCTAGCAGACACCAT	Nachweis Osteocalcin
OSTCAL 3'	GAGCTGCTGTGACATCCATAC	Nachweis Osteocalcin
PTHr 5'	GTTGCCATCATATACTGTTTCTGC	Nachweis PTHrTK
PTHr 3'	GGCTTCTTGGTCCATCTGTAA	Nachweis PTHrTK
Scx Int Fwd	CTGCGCACACTCATCCCCACC	Nachweis Scleraxis
Scx Int Rev	GGTGGGGATGAGTGTGCGCAG	Nachweis Scleraxis
Six1 3'	AGGCCTGGAAGAGAATAGTTT	Nachweis Six 1
Six1 5'	AGTTCTCGCCTCACAATCAC	Nachweis Six 1
Six2 3'	ACTGCCATTGAGCGAGGAAG	Nachweis Six 2
Six2 5'	GGCTCAAGGCGCACTACATC	Nachweis Six 2
EphA-4 5'	GCCGCCGGGTACACGACACTA	Nachweis von EphA 4
EphA-4 3'	AAGCCCCATGGTTTCAGCAATCTC	Nachweis von EphA 4
Tenomodulin 5'	CCCGCAGAAAAGCCTATTGAAAAC	Nachweis von Tenomodulin
Tenomodulin 3'	ACAGACACGGCGGCAGTAACG	Nachweis von Tenomodulin
Eya1 5'	ACGGGGTCCTACGCCAACAG	Nachweis von Eya1
Eya1 3'	GCCAGGGTCAGCCAGGAGTC	Nachweis von Eya1
Eya2 5'	AGGCCCCGTGTCATCTCATACCAT	Nachweis von Eya2
Eya2 3'	CGGCATAAGGCACGCACACTG	Nachweis von Eya2
OSF-2 Endo	TCTCGAATTCCGGAGCTCAGGGCTGA AGATGG	Nachweis von Periostin Klonierung
OSF-2-1 Int 5'	CTGCCCTGGCTATATGAGAATGGA	Nachweis von Periostin
OSF-2-1 Int 3'	GGGAGCAAAGAGCGTGAAGTGAC	Nachweis von Periostin
OSF-2-2 Int 5'	TCAAGGGCCTAGAAGACGAT	Nachweis von Periostin
OSF-2-2 Int 3'	CTGAGGCGGAAGGTTTTTA	Nachweis von Periostin
OSF-2-3 Int 5'	AGCAGCCGCCATCACCTC	Nachweis von Periostin Klonierung
OSF-2-3 Int 3'	TTTTCCAGCCAGCTCAATAACTT	Nachweis von Periostin
BMP2 5'	ACGAGGTCCTGAGCGAGTTC	Nachweis von BMP2
BMP2 3'	GATCGAAGCTCAATTAACCCTCAC	Nachweis von BMP2
BMPr-IA 5'	CTGCTTAAATTGGCTTATTCA	Nachweis von BMPr-IA
BMPr-IA 3'	GGGCACATCAACTTCATTTGT	Nachweis von BMPr-IA
Smad8 Flag 5'	TTCCGGATCCGCCACCATGGACTA	Nachweis von Smad8
Smad8 Flag 3'	TTCCGTCGACTGGAAATGCAGCTGAG CACATGAC	Nachweis von Smad8 Klonierung

**Tabelle 19:** Verwendete murine Primer für Real Time PCR

Primer	Sequenz	Verwendung
HPRT 5′	TCAACGGGGGACATAAAA	Nachweis von HPRT
HPRT 3′	ATTCAACTT GCGCTCATCTT	Nachweis von HPRT
Periostin 5′	AGCAGCCGCCATCACCTC	Nachweis von Periostin
Periostin 3′	TTTTCCAGCCAGCTCAATAACTT	Nachweis von Periostin

## 7.6 Molekulargewichtsmarker



**Abbildung 65:** Verwendete Molekulargewichtsmarker. A Full Range Rainbow Molecular Weight Marker von Amersham Bioscience. B GeneRuler™ 100bp DNA Ladder von MBI Fermentas. C Lambda DNA/ *Eco*RI + *Hind*III Marker, 3 von MBI Fermentas.

## 7.7 Verwendete Plasmide

**Tabelle 20:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Funktion	Herkunft
pShuttle	adenoviraler Klonierungsvektor	Clontech
pAdeno-X	adenoviraler Expressionsvektor	Clontech
pLox	lentiviraler Expressionsvektor	von Pierre Corbeau aus Montpellier zur Verfügung gestellt



## 7.8 Vektorkarten

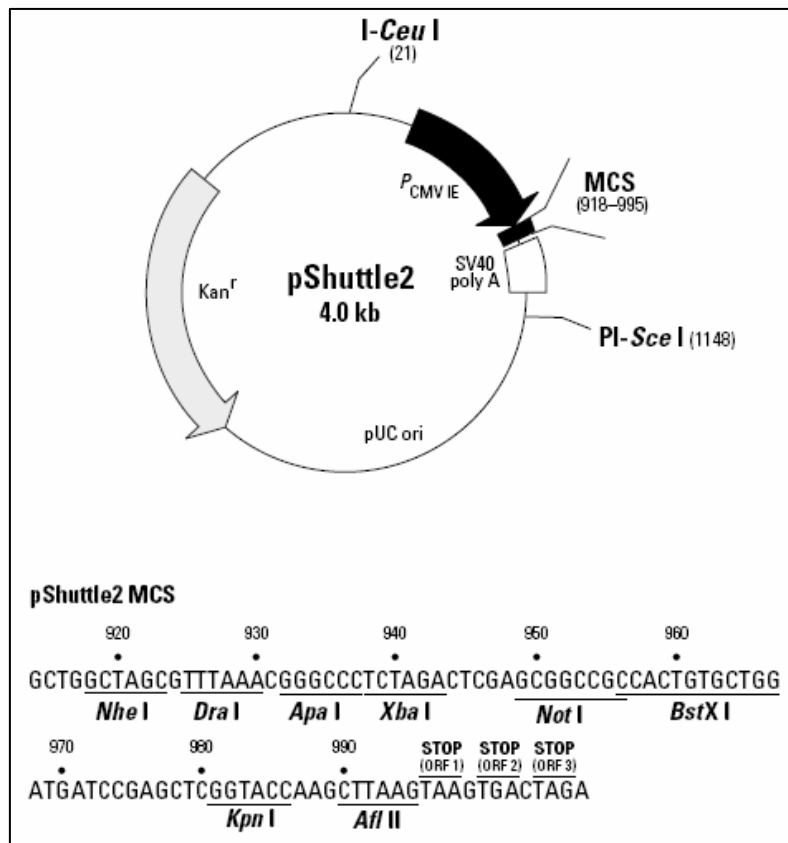


Abbildung 66: Plasmidkarte und MCS (multiple cloning site) von pShuttle

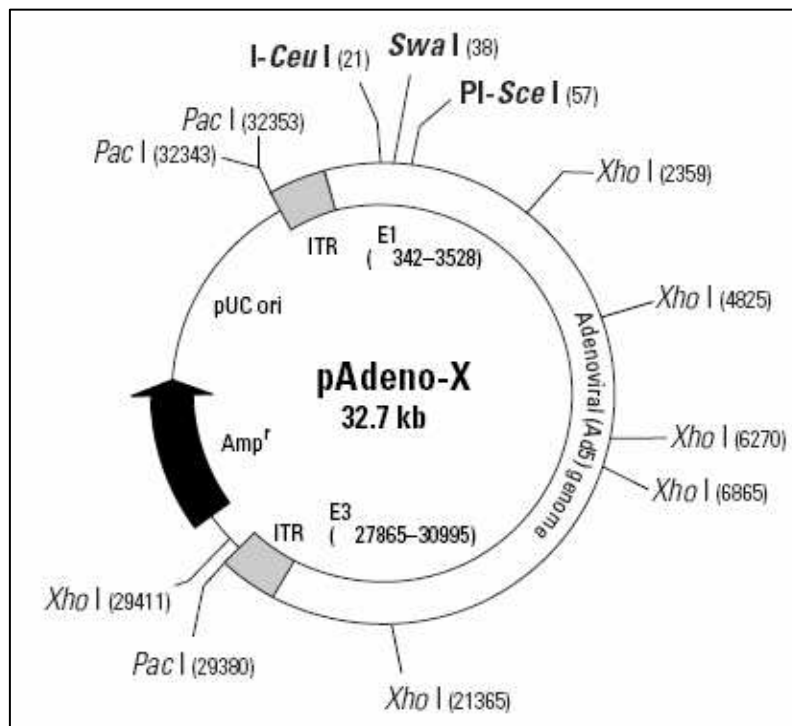


Abbildung 67: Plasmidkarte von Adeno-X

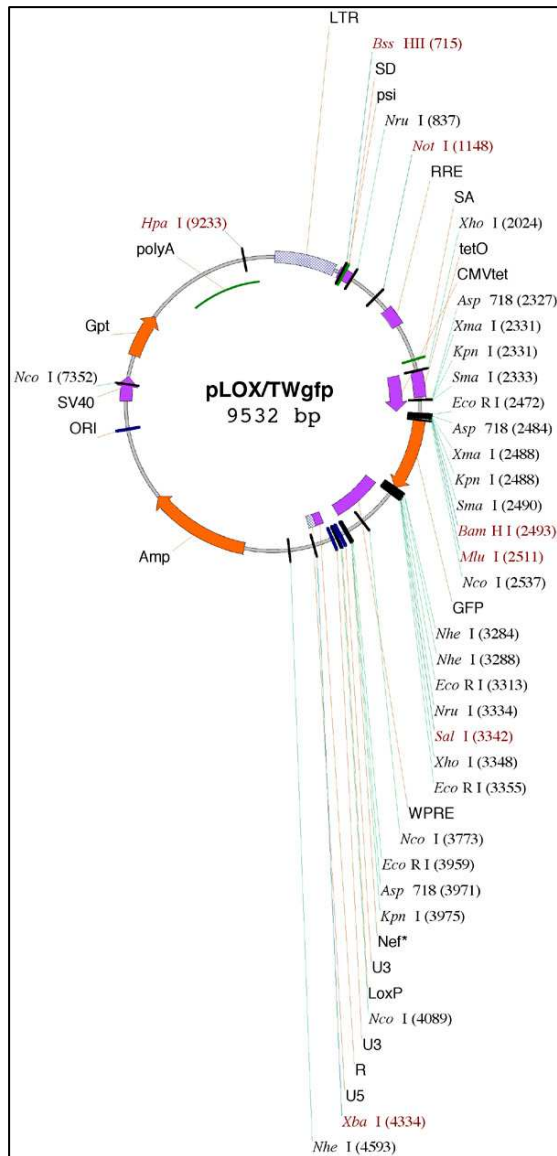


Abbildung 68: Plasmidkarte von pLox

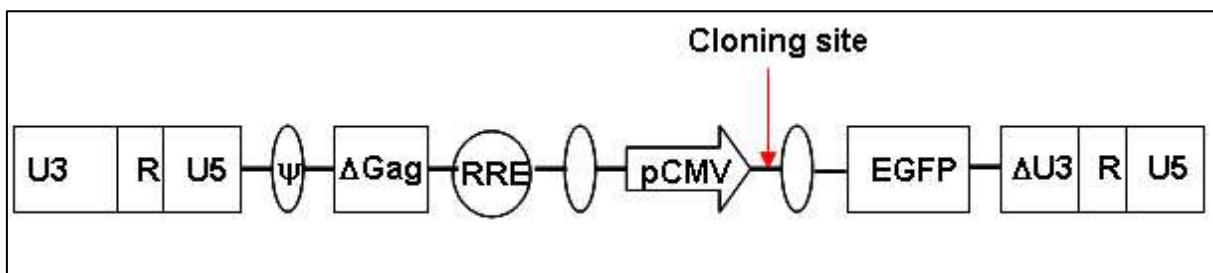
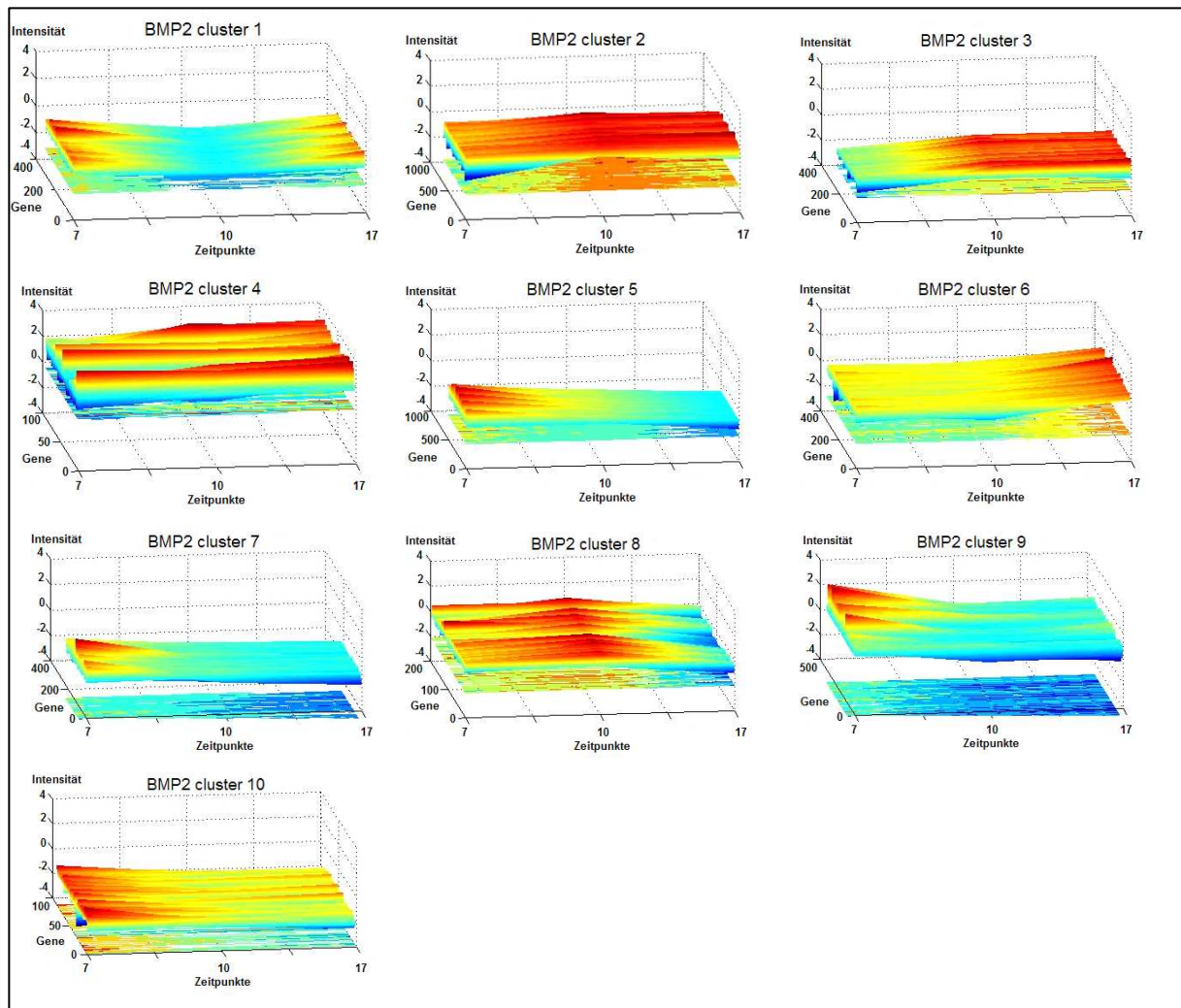


Abbildung 69: pHRTK-Vektor

## 7.9 Anordnung der exprimierten Gene in C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-Zellen in Gen-Cluster (Microarray Analyse)

Bei der BMP2-abhängigen Differenzierung in C3H10T1/2-Zellen wurden insgesamt 2990 differentiell exprimierte Gene gefunden, von denen während der Differenzierung 1469 hochreguliert und 1534 runterreguliert werden.



**Abbildung 70:** Anordnung der in den C3H10T1/2<sub>BMP2</sub>-exprimierenden Gene in Cluster. Grundlage für die Anordnung lieferte das ähnliche Expressionsprofil der Gene.

X-Achse = Zeitpunkt der Zellernte/RNA-Isolierung nach postkonfluenten Tagen in Kultur, Y-Achse = Expressionshöhe/Intensität der Gene, Z-Achse = Gene, die einem Cluster zugeordnet werden können

Rot = erhöhte Expression der Gene im Vergleich zu Tag 0; Gelb = Gleichbleiben der Expression; Türkis/Blau = Erniedrigung der Expression im Vergleich zu Tag 0

## 7.10 Verwendete Computerprogramme / Internet

DC Leica Viewer

Microsoft Office Word 2003

Microsoft Office Excel 2003

Microsoft Office Picture Manager 2003

Microsoft Office Adobe Photoshop 7.0

WinCam Version 2.0

MV acquire control configuration

Blast-search: [www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast)

Medline: [www4.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/medline.html](http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/medline.html)

Entrez nucleotide query: [www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=n&form](http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=n&form)

Microarray Suite image analysis software version 2.0

Bioconductor [www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)

## 7.11 Abkürzungen

<b>A</b>	Adenin	<b>LV</b>	Lentivirus
<b>A,P</b>	anterior-posterior	<b>M</b>	Mol
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>M,L</b>	medial-lateral
<b>abs.</b>	Absolut	<b>MCK</b>	muscle creatine kinase
<b>AD</b>	Adenoviren	<b>mg</b>	Milligramm
<b>AEC</b>	3-Amino-9-Ethylcarbazol	<b>MIK</b>	rtTA2S-M2 (Transaktivator) IRES (internal ribosomal entry site) KRAB (Repressor)
<b>AIDS</b>	acquired immunodeficiency syndrome	<b>min.</b>	Minute
<b>alk</b>	activine-like kinase	<b>ml</b>	Milliliter
<b>APS</b>	Ammoniumperoxydisulfat	<b>Mlu I</b>	Restriktionsendonuklease
<b>BamH I</b>	Restriktionsendonuklease	<b>mm</b>	Millimeter
<b>BCP</b>	1-Brom-3-Chlorpropan	<b>mM</b>	Millimol
<b>bHLH</b>	basic helix-loop-helix	<b>M-MLV RT</b>	Molony Murine Leukemia Virus RT
<b>BMP</b>	bone morphogenetic protein	<b>MOI</b>	multiplicity of infection
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>BRE</b>	BMP-dependent element	<b>msec.</b>	Millisekunde
<b>BSA</b>	bovine serum albumin	<b>MTJ</b>	Muskel-Sehnen-Übergang (Myotendinous Junction)
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>NBT/BCIP</b>	Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4- Chloro-3-Indolyl Phosphate
<b>c/cm<sup>2</sup></b>	Zellen pro Quadratcentimeter	<b>ng</b>	Nanogramm
<b>caSmad8</b>	konstitutiv aktives Smad8 (Smad8 L + MH2)	<b>nm</b>	Nanometer

<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	<b>NT</b>	Neuralrohr
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus	<b>OTJ</b>	Sehnen-Knochen-Übergang (Osteotendinous Junction)
<b>Co-Smad</b>	common mediator Smad-Protein	<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>D,V</b>	dorsal-ventral	<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol	<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>ddNTP</b>	Didesoxynukleotidtriphosphat	<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/ Streptomycin
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat	<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	<b>pg</b>	Pikogramm
<b>DML</b>	dorsomedial	<b>pmol</b>	Pikomol
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>PN</b>	peripherer Nerv
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>ppm</b>	parts per million
<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat	<b>PSM</b>	prä-somitisches Mesoderm
<b>Dox</b>	Doxycyclin	<b>Puro</b>	Puromycin
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA	<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluoridion
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>R-Smad</b>	rezeptor-spezifisches Smad-Protein
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>FACIT</b>	fibril-associated collagens with interrupted tripel helices	<b>rTA</b>	Transaktivator (Tet-System)
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum	<b>rTetR</b>	mutiertes TetR-Gen, reverses TetR
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor	<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkription PCR
<b>FITC</b>	Fluoreszeinthiocyanat	<b>rTS</b>	Doxycyclin abhängiger Silencer
<b>FZ</b>	Fibroblastoide Zellen	<b>S</b>	Sehnenstruktur
<b>g</b>	Erdbeschleunigung	<b>Sal I</b>	Restriktionsendonuklease
<b>g</b>	Gramm	<b>SAP</b>	Shrimp Alkaline Phosphatase
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykan	<b>SBE</b>	smad binding element
<b>GDF</b>	growth and differentiation factor	<b>Scx</b>	Scleraxis
<b>GFP</b>	green fluorescent protein	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>GTC</b>	Guanidin-Thiocyanat	<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
<b>H&amp;E</b>	Hämatoxylin und Eosin	<b>sec.</b>	Sekunde
<b>HBS</b>	HEPES buffered saline	<b>Shh</b>	Sonic hedgehog
<b>HEK</b>	humane embryonale Nierenzelle	<b>β-gal</b>	β-Galactosidase
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N- ethansulfonsäure	<b>SURE</b>	Stop unwanted Rearrangement Events
<b>Hind III</b>	Restriktionsendonuklease	<b>T</b>	Thymidin
<b>HIV</b>	humane Immundefizienzviren	<b>TAE</b>	Tris/ Acetat/ EDTA

<b>HK</b>	hyaliner Knorpel	<b>TC</b>	tissue culture
<b>HLH</b>	helix-loop-helix	<b>TE</b>	Tris/ EDTA
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyl-Transferase	<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
<b>huMSCs</b>	humane mesenchymale Stammzellen	<b>TEP</b>	Trypsin/ EDTA/ PBS
<b>IgG H+L</b>	Immunglobulin G schwere und leichte Kette	<b>tetO</b>	Tetracyclin-Resistenz-Operon
<b>i.P.</b>	infektiöse Partikel	<b>tetR</b>	Tetracyclin-Repressor-Domäne
<b>I-Smad</b>	inhibitorisches Smad-Protein	<b>TRITC</b>	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
<b>K</b>	Knochen	<b>U</b>	Unit
<b>Kn</b>	Knorpel	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>kb</b>	Kilobasen	<b>V</b>	Volt
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton	<b>v/v</b>	volume per volume
<b>KRAB</b>	Krüppel-Associated Box	<b>VLL</b>	ventrolateral
<b>KS</b>	Kollagenschwamm	<b>w/v</b>	weight per volume
<b>kV</b>	Kilo-Volt	<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>KZ</b>	Knorpelzellen	<b>λ</b>	Lambda
<b>l</b>	Liter	<b>Ψ</b>	Verpackungssignal (Retroviren)
<b>LB</b>	Luria Bertani	<b>Ω</b>	Ohm, elektrischer Widerstand
<b>LMP</b>	low melting point	<b>μl</b>	Mikroliter
<b>Lsg.</b>	Lösung	<b>μm</b>	Mikrometer
<b>LTR</b>	long terminal repeats	<b>μM</b>	Mikromol



## 8 Literatur

- Arai, K., Kasashima, Y., Kobayashi, A., Kuwano, A., Yoshihara, T. (2002)** TGF-beta alters collagen XII and XIV mRNA levels in cultured equine tenocytes. *Matrix Biol* 21: 243-250
- Attisano und Wrana, 2002** Signal transduction by the TGF-beta superfamily (2002) *Science* 31;296(5573):1646-7. Review.
- Baker, J. C., Harland, R. M. (1996)** A novel mesoderm inducer, *Madr2*, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 10: 1880-1889
- Bao, S., G. Ouyang, X. Bai, Z. Huang, C. Ma, M. Liu, R. Shao, R. M. Anderson, J. N. Rich, and X. F. Wang (2004)** Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell* 5:329-339
- Benjamin, R., Ralphs, J. R. (1997)** Tendons and ligaments – an overview. *Histol. Histopathol* 12: 1135-1144
- Benjamin, R., Ralphs, J. R. (2000)** The cell and development biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol* 196: 85-130
- Birk and Mayne (1997)** Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur J. Cell Biol.* 72(4): 352-61
- Brandau, O., Meindl, A., Fassler, R., Aszodi, A. (2001)** A novel gene, *tendin*, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I. *Dev Dyn* 221: 72-80
- Brent, A. E., Schweitzer, R., Tabin, C. J. (2003)** A Somitic Compartment of Tendon Progenitor. *Cell* 113: 235-248
- Bruder , S.P, Fink, D.J. and Caplan A.I. (1994)** Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J.Cell.Biochem.* 56: 283-294
- Burt and Paton (1992)** Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family. *DNA Cell Biol.* 11(7): 497-510
- Canty, E. G., Kadler, K. E. (2002)** Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. *Comp. Biochem. Physiol A* 133: 979-985
- Caplan, A. I. (2005)** Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. *Tissue Engineering* 11: 1198-1211
- Celeste et al. (1990)** Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(24):9843-7.
- Dennis, J.E., et al, (1999)** A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J.Bone Miner.Res* 14: 700-70
- Docheva, D., Hunziker, E. B., Fässler, R., Brandau, O. (2005)** Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Molecular and Cellular Biology* 699-705
- Doherty, M. J., Canfield, A. E. (1999)** Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene expr* 9: 1-17
- D’Souza, D., Patel, K. (1999)** Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development. *Anat Embryol (Berl)* 200: 367-375
- Edom-Vovard, F., Bonnin, M. A., Duprez, D. (2001a)** *Fgf8* transcripts are located in tendons during embryonic chick limb development. *Mech Dev* 108:203-206

- Edom-Vovard, F., Duprez, D. (2003)** Signals regulating tendon formation during chick embryonic development. *Developmental Dynamics* 229: 449-457
- Gazit et al, 2002** Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. *J Cell Biochem.* 86(3):461-74.
- Hashimoto, Yusuke, Yoshida, Gen et al. (2007)** Generation of tendon-to-bone interface enthesis with use of recombinant BMP-2 in a rabbit model, Inc. *J Orthop Res* 25:1415-1424
- Heldin, C. H., Miyazono, K., Ten Dijke, P. (1997)** TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471
- Hoffmann, A., Pelled, G., Turgeman, G., Eberle, P., Zilberman, Y., Shinar, H., Keinan-Adamsky, K., Winkel, A., Shahab, S., Navon, G., Gross, G., Gazit, D. (2006)** Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Investigation* 116: 940-952
- Hoffmann, A and Gross, G. (2006)** Tendon and ligament engineering: from cell biology to in vivo application. *Regenerative medicine* 563-574
- Hogan (1996)** Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev.* 6(4):432-8. Review
- Horiuchi, K., N. Amizuka, S. Takeshita, H. Takamatsu, M. Katsuura, H. Ozawa, Y. Toyama, L. F. Bonewald, and A. Kudo (1999)** Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res.* 14:1239-1249
- Hurle, J. M., Hinchliffe, J. R., Ros, M. A., Critchlow, M. A., Genis-Galvez, J. M. (1989)** The extracellular matrix architecture relating to myotendinous pattern formation in the distal part of the developing chick limbs: an ultrastructural, histochemical, and immunocytochemical analysis. *Cell Differ Dev* 27: 103-120
- Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P (2000)** Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* Dec (24):6954-67
- Jackson, D.W., Simon, T.M., Kurzweil, P.R., and Rosen, M.A. (1992)** Survival of cells after intraarticular transplantation of fresh allografts of the patellar and anterior cruciate ligaments. DNA-probe analysis in a goat model. *J. Bone Joint Surg. Am.* 74: 112-118
- Józsa, L., Kannus, P. (1997)** Human Tendons: Anatomy, Physiology, and Pathology. *Human Kinetics*
- Welsch, U. (2006)** Lehrbuch Histologie. 2. Auflage, Urban und Fischer Verlag
- Kalchauer, C., Ben-Yair, R. (2005)** Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Current Opinion in Genetics & Development* 15: 371-380
- Kannus, P. (2000)** Structure of tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10: 312-320
- Kardon, G. (1998)** Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 125: 4019-4032
- Katsuragi, N., R. Morishita, N. Nakamura, T. Ochiai, Y. Taniyama, Y. Hasegawa, K. Kawashima, Y. Kaneda, T. Ogihara, and K. Sugimura (2004)** Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation. *Circulation* 110:1806-1813.
- Kingsley, D. M. (1994A)** The TGF- $\beta$  superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8: 133-146
- Koenig et al (1994)** Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* ;14(9):5961-74.
- Kretschmar, M., Doody, J., Massague, J. (1997a)** Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- $\beta$  family mediator Smad1. *Nature* 389: 618-622

- Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J., Massague, J. (1997b)** The TGF- $\beta$  family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11: 984-995
- Kriegelstein, Strelau et al (2002)** TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris*. 96(1-2):25-30. Review.
- Kruzynska-Frejtag, A., J. Wang, M. Maeda, R. Rogers, E. Krug, S. Hoffman, R. Markwald, and S. J. Conway (2004)** Periostin is expressed within the developing teeth at the sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Dev. Dyn.* 229:857-868.
- Liu, F., et al. (1996)** A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*. 381: 620-623
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., Wrana, J. L. (1996)** MADR2 is a substrate of the TGF- $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signalling. *Cell* 87: 1215-1224
- Masagué, (1998)** TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.*, 67:753-91
- Masagué, Blain et al, (2000)** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 13;103(2):295-309. Review
- Massagué and Ye-Guang Chen (2001)** Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Genes and Development* Vol. 14, No. 6, pp. 627-644
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T., Hurle, J. M. (1998)** Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signalling. *Dev Biol* 200: 35-45
- Meyer, J. M., J. V. Ruch, M. Kubler, C. Kupferle, and H. Lesot (1995)** Cultured incisors display major modifications in basal lamina deposition without further effect on odontoblast differentiation. *Cell Tissue Res*. 279:135-147
- Mikic, B. Schalet, B.J., Clark, R., Gaschen, V., and Hunziker, E.B. (2001)** GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and composition of the Achilles tendon. *J.Orthop.Res.* 19: 365-371
- Murchison et al (2007)** Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development*.134(14):2697-708.
- Niederreither et al (1995)** Coordinate patterns of expression of type I and III collagens during mouse development. *Matrix Biol*.14(9):705-13.
- Ohuchi, H., Kimura, S., Watamoto, M., Itoh, N. (2000)** Involvement of fibroblast growth factor (FGF) 18-FGF8 signalling in specification of left-right asymmetry and brain and limb development of the chick embryo. *Mech Dev* 95: 55-66
- Oliver, G., Wehr, R., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Cheyette, B. N., Hartenstein, V., Zipursky, S. L., Gruss, P. (1995)** Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development* 121: 693-705
- Olsen, E.J., et al. (1998).** The biochemical and histological effects of artificial ligament wear particles: in vitro and in vivo studies. *Am. J. Sports Med.* 16: 558-570
- Patel, K., Nittenberg, R., D'Souza, D., Irving, C., Burt, D., Wilkinson, D. G., Tickle, C. (1996)** Expression and regulation of Cek-8, a cell to cell signalling receptor in developing chick limb buds. *Development* 122: 1147-1155

- Ralphs et al, (1998)** Regional differences in cell shape and gap junction expression in rat Achilles tendon: relation to fibrocartilage differentiation. *J Anat.*193 (Pt 2):215-22
- Rios H, Koushik SV, Wang H, Wang J, Zhou HM, Lindsley A, Rogers R, Chen Z, Maeda M, Kruzynska-Frejtag A, Feng JQ, Conway SJ. (2005)** Periostin Null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol* 24: 11131-11144
- Ros, M. A., Rivero, F. B., Hinchliffe, J. R., Hurle, J. M. (1995)** Immunohistological and ultrastructural study of the developing tendons of the avian foot. *Anat Embryol (Berl)* 192: 483-496
- Ruppert et al, (1996)** Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem.* 237(1):295-302
- Sabiston, P, Frank, C.m Lam, T., and Shrive, N. (1990)** Allograft ligament transplantation. A morphological and biochemical evaluation of a medial collateral ligament complex in a rabbit model. *Am. J. Sports Med.* 18: 160-168
- Schweitzer, R., Chyung, J. H., Murtaugh. L. C., Brent, A. E., Rosen, V., Olson, E. N., Lassar, A., Tabin, C. J. (2001)** Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 128: 3855-3866
- Sekelsky, Newfeld et al, 1995** Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.*139(3):1347-58.
- Settle, S.H., Jr., et al (2003)** Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse GDF6 and GDF5 genes. *Dev.Biol.* 254: 116-130
- Souchelnytskyi, ten Dijke et al, (1996)** Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *EMBO J* ;16(19):6055
- Stanton, L. W., L. Garrard, D. Damm, B. Garrick, A. Lam, A. M. Kapoun, Q. Zheng, A. Protter, G. Schreiner, and R. T. White (2000)** Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ. Res.* 86:939-945.
- Taylor, S. M., Jones, P. A. (1979)** Multiple new phenotypes induced in 10T½ and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17: 771-779
- Ten Dijke, (1994)** Serine/threonine kinase receptors. *Prog Growth Factor Res.*;5(1):55-72.
- Ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C. H. (2000)** Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-β Signalling. *Trends Biochem Sci* 25(2): 64-70
- Ten Dijke, Goumans et al, (2002)** Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol.*; 191(1):1-16. Review.
- Tylzanowski, P., De Valck, D., Maes, V., Peeters, J., Luyten, F. P. (2003)** Zfhx 1a and Zfhx 1b mRNAs have non-overlapping expression domains during chick and mouse midgestation limb development. *Gene Expr Patterns* 3: 39-42
- Urist (1965)** Bone: formation by autoinduction. *Science.*150(698):893-9
- Welsch, U. (2006)** Lehrbuch Histologie. 2. Auflage, Urban und Fischer Verlag
- Wieser, Wrana et al, 1995** GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J.*14(10):2199-208

- Wilmott, R.W., Amin, R.S., Perez, C.R. (1996)** Safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lungs of nonhuman primates *Hum. Gene. Ther.* 7: 301-318
- Wolfman, N. M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A. J., Nelson, R., Yamaji, N., Dube, J. L., Diblasio-Smith, E., Nove, J., Song, J. J., Wozney, J. M., Rosen, V. (1997)** Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* 100: 321-330
- Wozney (1989)** Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth factor Res* 1: 267-280
- Wozney et al (1998)** Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346: 26-37
- Wrana, Attisano et al. (1994)** Mechanismn of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 370: 341-347
- Xu, P. X., Cheng, J., Epstein, J. A., Maas, R. L. (1997)** Mouse Eya genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11974-11979
- Yang, Y., Nunes F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., Wilson, J.M. (1994)** Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4407-4411
- Zschäbitz, A. (2005)** Anatomie und Verhalten von Sehnen und Bändern. *Orthopäde* 34:516-525

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen, mich für die ausgiebig erhaltene Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit zu bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Gerhard Gross für die Überlassung des Themas und das ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er stand mir mit zahlreichen Diskussionen zu speziellen Problemen der Doktorarbeit zur Seite. Seine positive Einstellung hat mich bei auftretenden Schwierigkeiten sehr ermutigt.

Den größten Dank verdient meine Betreuerin, PD Dr. Andrea Hoffmann, die mir eine hervorragende Unterstützung während der gesamten Zeit der Erstellung der Doktorarbeit gab. Sie hat diese Arbeit mit ihren Ideen, ihrer Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben und hatte stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen.

Ein herzliches Dankeschön an Andreas, Carolin, Doris, Daniela, Gini, Imke, Inge, Janett, Sabrina, Sandra und Stephie für die nette und humorvolle Atmosphäre im Labor. Vielen Dank auch an die gesamte 3. Etage für die großartige Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank an Herrn Dr. Frank Witte von der Medizinischen Hochschule Hannover. Er hat mir bei einigen chirurgischen Eingriffen für die Implantation der Kollagenschwämme zur Seite gestanden.

Bei Dr. Ulrike Nuber und Falk Hertwig von der Lund University in Schweden möchte ich mich ganz herzlich für die Durchführung des Microarrays bedanken.

Vielen Dank an all meine Freunde, insbesondere an meine beste Freundin Bianca, die für die von Zeit zu Zeit nötige Ablenkung sorgten und mit denen ich schöne und abwechslungsreiche Stunden in unserem Lieblingscafé verbringen durfte.

Ich danke meiner Schwester Danny, ihrem Mann Maic und ihrem Sonnenschein Kiara, die mir sehr viel bedeuten und die mich moralisch immer unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Eva und Kadir bedanken, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben und mich in all meinem Tun immer unterstützen. Vielen Dank für alles – ihr seid die Besten.

Als letztes möchte ich mich bei meinem Mann Sven bedanken, der immer für mich da ist und der mich während meiner Doktorarbeit unterstützte und vor allem auch beim Zusammenschreiben meiner Arbeit immer wieder aufbaute.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Shahab-Osterloh, geb. Shahab

Vorname: Sandra

Geburtsdatum, -ort: 16.01.1978 in Braunschweig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Abdul-Kadir Shahab, Krankenpfleger  
Eva-Maria Shahab, Krankenschwester

Anschrift: Stralsundstr.1  
38124 Braunschweig

**Schulbesuche:** August 1984 bis Juni 1990 Grundschule Bebelhof  
August 1990 bis Juni 1992 Orientierungsstufe Heidberg  
August 1992 bis Juni 1998 Gymnasium Raabeschule

**Studium:** Oktober 1998 bis Februar 2001 Biologiestudium an der TU Carolo  
Wilhelmina zu Braunschweig mit Abschluss des Vordiploms

März 2001 bis Februar 2004 Hauptstudium Biologie an der TU Carolo  
Wilhelmina zu Braunschweig bis zum Erhalt des Diploms

Mai 2003 bis Februar 2004 Anfertigung der Diplomarbeit im Rahmen  
des Biologiestudiums am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung  
in der Abteilung Genregulation und Differenzierung zum Thema  
„Modifizierung der Entwicklung von Bindegewebszellen durch einen  
inflammatorischen Signalmediator ( TAK1 )“

Seit dem 15. März 2004 arbeite ich im Rahmen meiner Doktorarbeit als  
wissenschaftliche Mitarbeiterin am Helmholtz-Zentrum für  
Infektionsforschung GmbH in Braunschweig.

## **Allgemeine Veröffentlichungen:**

Modifizierung der Entwicklung von Bindegewebszellen durch einen inflammatorischen  
Signalmediator ( TAK1 ); Diplomarbeit, Februar 2004

Hoffmann A, Preobrazhenska O, Wodarczyk C, Medler Y, Winkel A, Shahab S, Huylebroeck  
D, Gross G, Verschueren K. Transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1), a  
MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine  
mesenchymal progenitors. J Biol Chem. 2005 Jul 22;280(29):27271-83.